



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de la diferenciación dopaminérgica de células troncales pluripotentes inducidas con triplicación del gen de alfa-sinucleína en un modelo de la enfermedad de Parkinson”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Médico Cirujano Luis Daniel Bernal Conde

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Magdalena Guerra Crespo  
[Instituto de Fisiología Celular](#)  
[Facultad de Medicina/UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia  
[Facultad de Medicina/UAEM](#)

Dr. Mario Arturo Alonso Vanegas  
[Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Diciembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## **Agradecimientos Académicos**

Este proyecto se llevó a cabo 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 de la UNAM. El autor recibió por parte del CONACYT la beca de maestría No. 484013. Para la realización de este trabajo se contó con el donativo de DGAPA-PAPIIT IN207116 e IN211419 y CONACyT A1-S-10064.

Gracias por la ayuda y participación de la Bióloga experimental Marcela Palomero Rivero del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que nos auxilió e instruyó en el correcto manejo de los animales usados, la obtención de las muestras y logística; de igual manera a la Bióloga Diana Millán Aldaco por su colaboración en el corte de los encéfalos, así como en aspectos logísticos y metodológicos.

A Sandra Daniela Rodríguez Montaña de la unidad de histología del IFC de la UNAM que también nos brindó constante y valioso apoyo en la enseñanza y procesamiento de diversas muestras.

A la M. V. Z Claudia V. Rivera Cerecedo y al equipo del Bioterio del IFC de la UNAM por proveernos de animales con los mayores estándares de calidad.

A Francisco Pérez Eugenio y a Ana María Escalante Gonzalbo de la Unidad de Computo IFC de la UNAM, por su apoyo en temas relacionados con logística, hardware y software.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia y el Dr. Abraham Rosas Arellano de la Unidad de Microscopía del IFC de la UNAM por su enseñanza, paciencia y tiempo en la obtención de imágenes por microscopía.

Al M.C. Andrés Martín Saralegui Amaro y a la Q.F.B. Xóchitl del Carmen Alvarado del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por la ayuda en la obtención de las imágenes por microscopía.

Al Biólogo Omar Collazo Navarrete y a la Dra. Gilda Guerrero Flores del Laboratorio Nacional de Recursos Genómico por su tiempo, consejos e insumos brindados.

A la Dra. Birgitt Schüle de la Universidad de Stanford por la colaboración académica, las líneas celulares donadas, los insumos provistos y las reflexiones dadas.

Al Dr. Iván Velasco Velásquez del IFC de la UNAM, al Dr. Jesús Santa Olalla Tapia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y al Dr. Mario Arturo Alonso Vanegas del Instituto de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” por formar parte de mi comité tutorial, por su tiempo, consejos, retroalimentación y asesoría.

Al Dr. René Drucker Colin (Q.E.P.D.) del IFC de la UNAM y al Dr. Rubén Argüero Sánchez del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la UNAM por su apoyo logístico, fue invaluable.

A la Dra. Magdalena Guerra Crespo gracias por acogerme como su alumno, por la paciencia dada, las enseñanzas brindadas, la retroalimentación incondicional recibida, la confianza depositada y el tiempo y recursos otorgados, me hizo un mejor estudiante, profesional y persona.

## **Agradecimientos personales**

*A mi sobrino Darío por llenar mi vida de alegría, amor y felicidad.*

*A mi hermana Maru por el cuidado, consejos, apoyo y amor que siempre me ha dado.*

*A mis abuelitos Sergio y Maru por ser parte fundamental de lo que soy y un ejemplo a seguir.*

*A mi madre, por todo, por la vida, amor, cariño, comprensión, por siempre creer en mí, por aconsejarme, protegerme, guiarme y ser junto a mi hermana y sobrino el pilar fundamental de mi ser, he llegado hasta aquí gracias a ustedes, son mi orgullo y fortaleza, lo mejor que me ha pasado. Me faltaría tiempo para poder terminar de expresar mi gratitud y amor hacia ustedes.*

*A Dios por la oportunidad de existir.*

*A la Dra. Magda por ser mi tutora, por guiarme en esta etapa de mi formación académica, por la reflexión, enseñanza y aprendizaje que siempre me ha brindado.*

*A mis amigos del laboratorio (Rodrigo, Alejandra, Verónica, Alexia, Denisse, Mario, Andrea y Brayan) de los cuales siempre recibí aprendizaje, empatía, consejos y momentos divertidos.*

*A las ratas de laboratorio del mundo, porque nos dan la oportunidad de mejorar y entender la vida.*

*A Romeo y Alberto por ser amigos que se convirtieron en hermanos.*

*A Rosita y Sigifredo junto con la familia García Conde y Hatami Madrigal por los buenos momentos que me han brindado.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser un hogar y darme la oportunidad de continuar mis estudios.*

# Contenido

<b>1. Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>2. Resumen</b>	<b>9</b>
2.1 Abstract	10
<b>3. Introducción</b>	<b>11</b>
3.1 Enfermedad de Parkinson	11
3.2 Epidemiología	11
3.3 Histopatología	11
3.4 $\alpha$ -sinucleína	12
3.5 Fisiopatología de la $\alpha$ -sinucleína	14
3.6 Tratamiento	16
3.7 Pronóstico	16
3.8 Células troncales	16
3.9 Células troncales pluripotentes: Embrionarias e inducidas	17
3.10 Diferenciación dopaminérgica mesencefálica en el desarrollo embrionario	18
3.11 Diferenciación dopaminérgica <i>in vitro</i>	20
3.11.1 Diferenciación dopaminérgica a través de estructuras neuroepiteliales	20
3.11.2 Diferenciación inducida mediante el uso de moléculas pequeñas	21
3.12 Reemplazo con células troncales en la enfermedad de Parkinson	22
3.13 La SNpc como sitio blanco de trasplante celular	22
3.14 Células con triplicación del locus del gen SNCA como modelo de la EP	23
3.15 Generación de la línea celular <i>knockout</i> isogénica de 3X SNCA	24
<b>4. Justificación</b>	<b>25</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b>6. Objetivo general</b>	<b>25</b>
<b>7. Objetivos particulares</b>	<b>25</b>
<b>8. Materiales y Métodos</b>	<b>26</b>
8.1 Cultivo celular	27
8.1.1 Descripción General	27
8.1.2 Especificación	28
8.1.3 Expansión	28
8.2 Preparación celular para trasplante	28
8.3 Generación del modelo experimental de EP en ratas	29
8.3.1 Lesión con 6-OHDA	30
8.3.2 Prueba de giro inducida con anfetamina	31
8.4 Trasplante celular	31
8.5 Inmunosupresión	31
8.6 Eutanasia y extracción del encéfalo	31
8.7 Inmunofluorescencia	32
8.7.1 Inmunofluorescencia <i>in vitro</i>	32
8.7.2 Inmunofluorescencia <i>ex vivo</i>	32
8.8 Microscopía	33
8.8.1 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson	33
8.9 Análisis estadístico	33
<b>9. Resultados</b>	<b>34</b>
9.1 Diferenciación dopaminérgica <i>in vitro</i>	34
9.1.1 Las células con 3X SNCA son capaces de desarrollar un fenotipo neuronal <i>in vitro</i>	34
9.1.2 La línea celular 3X SNCA es capaz de desarrollar un fenotipo dopaminérgico <i>in vitro</i>	36
9.2 Diferenciación dopaminérgica <i>in vivo</i>	47
9.2.1 Las células de la PP de la línea celular 3X SNCA son capaces de sobrevivir en la SNpc de rata.	47
9.2.2 La SNpc lesionada es permisiva al mantenimiento neuronal de la línea 3X SNCA	49

9.2.3 La línea celular 3X SNCA trasplantada en etapa de PP expresa $\alpha$ -sinucleína <i>in vivo</i> .....	52
9.2.4 La línea celular 3X SNCA trasplantada en el quinto día de la fase de maduración no muestra supervivencia a 2 meses post-trasplante .....	54
9.2.5 La SNpc no facilita a 15 días y a 2 meses post-trasplante la maduración neuronal de las células trasplantadas en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica .....	56
9.2.6 La línea celular 3X SNCA trasplantada en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica expresa $\alpha$ -sinucleína <i>in vivo</i> .....	58
9.2.7 La expresión de TH es baja a 15 días y 2 meses post-trasplante en las células derivadas de la PP y del quinto día de la fase maduración dopaminérgica .....	60
9.2.8 El trasplante celular no mejora la conducta motora en los animales lesionados .....	66
<b>10. Discusión .....</b>	<b>68</b>
12.1 $\alpha$ -sinucleína y la diferenciación dopaminérgica <i>in vitro</i> .....	68
10.2 Trasplantes celulares en la SNpc.....	71
10.3 Trasplantes celulares en el núcleo estriado .....	75
10.4 Número de células y tiempo del trasplante como determinantes a considerar para la maduración dopaminérgica <i>in vivo</i> .....	76
<b>11. Conclusiones .....</b>	<b>77</b>
<b>12. Perspectivas .....</b>	<b>77</b>
<b>13. Referencias .....</b>	<b>78</b>
<b>14. Anexos .....</b>	<b>88</b>
Tabla anexa 1. Resumen de resultados de la diferenciación dopaminérgica en cultivo.....	88
Tabla anexa 2. Resumen de resultados de los trasplantes realizados en etapa de placa de piso. ....	89
Tabla anexa 3. Resumen de resultados de los trasplantes realizados en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica. ....	90

## 1. Abreviaturas

$\alpha$ -sinucleína positiva.....	$\alpha$ -SYN <sup>+</sup>
6-hidroxidopamina .....	6-OHDA
Ácido ascórbico.....	AA
Adenosín monofosfato cíclico.....	cAMP
Buffer fosfato salino.....	PBS
Buffer fosfato salino de Dulbecco.....	DPBS
Buffer fosfato salino Inmuno .....	PBSi
Cadena transportadora de electrones .....	CTE
Células pluripotentes inducidas .....	iPSC
Células pluripotentes inducidas de humano .....	hiPSC
Células troncales embrionarias.....	ESC
Células troncales embrionarias de humano.....	hESC
Componente no amiloide .....	NAC
Cromatografía líquida de alta eficacia .....	HPLC
Cuerpos de Lewy .....	CL
Cuerpos embrioides .....	CE
Días post-trasplante .....	dpt
Dibutilil adenosín monofosfato cíclico.....	dcAMP
Enfermedad de Parkinson.....	EP
Especies reactivas de oxígeno .....	ROS
Factor de crecimiento fibroblástico 2 .....	FGF2
Factor de crecimiento fibroblástico 8 .....	FGF8
Factor de crecimiento transformante beta 3.....	TGF- $\beta$ 3
Factor Inhibidor de la Leucemia .....	LIF
Factor neurotrófico derivado de la glía .....	GDNF
Factor neurotrófico derivado del cerebro.....	BDNF
Factor de transcripción .....	FT
Homeocaja 1 alfa asociado a LIM.....	Lmx1a
Homeocaja 1 beta asociado a LIM.....	Lmx1b
Homeocaja 2 de gastrulación cerebral .....	Gbx2
Homeocaja pituitaria 3 .....	Pitx3
Homeosecuencias emparejadas-2.....	Pax2
Homólogo de ortodentículo 2.....	Otx2
Homólogo Sonic hedgehog.....	Shh
Intervalo de confianza.....	IC
<i>Krüppel-like factor 4</i> .....	KLF4
Lmx1a, FoxA2 y Otx2.....	LFO
Meses post-trasplante .....	mpt
<i>Octamer-binding protein 3/4</i> .....	OCT3/4
Organizador del istmo .....	Odl



Pares de bases .....	pb
Placa de piso.....	PP
Proteína A2 de la caja de pinza.....	foxA2
Proteína morfogénica del hueso.....	BMP
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real .....	qRT-PCR
Semanas post-trasplante .....	spt
Sustancia nigra <i>pars compacta</i> .....	SNpc
<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i> .....	Sox2
Tejido mesencefálico ventral fetal humano .....	hfVM
Tirosina hidroxilasa .....	TH
Tirosina hidroxilasa fosforilada en el residuo de serina 40 .....	TH ps40
Transportador de dopamina .....	DAT
Transportador vesicular 2 de monoaminas .....	Vmat2

## 2. Resumen

La triplicación del gen SNCA (3X SNCA) que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína genera una enfermedad de Parkinson (EP) de inicio temprano, con manifestaciones clínicas exacerbadas en comparación a la EP de origen idiopática, pero con el mismo hallazgo histológico característico, la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc), lo que sugiere el papel de esta proteína en el desarrollo de la enfermedad. A pesar de los avances en el estudio de la  $\alpha$ -sinucleína en el proceso patológico de la EP, sus implicaciones en el proceso de diferenciación dopaminérgica no son claras. En este sentido, las células troncales pluripotentes inducidas de humano (hiPSC) son una herramienta esencial al permitir el modelado de la EP en el fenotipo celular principalmente afectado, el dopaminérgico. Por otra parte, demostramos que la SNpc intacta es un nicho permisivo para la diferenciación neuronal de células troncales embrionarias de ratón. De manera interesante, cuando la SNpc es lesionada con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) se favorece la diferenciación dopaminérgica.

Con el objetivo de determinar si la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína tiene implicaciones sobre el potencial dopaminérgico, empleamos una línea de hiPSC proveniente de un paciente con EP por la 3X SNCA (4 alelos), una línea de hiPSC proveniente de la hermana sana del paciente sin dicha triplicación (Control, 2 alelos) y una hiPSC *knockout* para los 4 alelos, isogénica de la línea celular 3X SNCA (SNCA 4KO).

Al estudiarlas *in vitro* observamos que las tres líneas celulares son capaces de desarrollar un fenotipo dopaminérgico mesencefálico, caracterizado por la expresión de Lmx1a (Control 67.56%, 3X SNCA 68.47% y SNCA KO 74.10%) y tirosina hidroxilasa (TH) (Control 24.76%, 3X SNCA 48.14% y SNCA KO 62.18%), por lo que la 3X SNCA no parece afectar la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico en cultivo.

Para su estudio *in vivo*, las líneas celulares fueron trasplantadas en dos etapas de diferenciación dopaminérgica, en etapa de placa de piso (PP) (FoxA2<sup>+</sup>/Otx2<sup>+</sup>/Lmx1a<sup>-</sup>/TH<sup>-</sup>) y en fase temprana de diferenciación dopaminérgica (LMX1<sup>+</sup>/ baja expresión de TH) sobre la SNpc de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y controles con solución salina (SS).

En etapa de PP, tanto a 15 días post-trasplante (15 dpt) como a 2 meses post-trasplante (2 mpt) la línea de 3X SNCA sobrevive con un porcentaje similar a las otras dos líneas celulares. Así mismo, a 15 dpt las tres líneas celulares permanecieron con un fenotipo neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina<sup>+</sup>/doblecortina<sup>+</sup>), mientras que a 2 mpt las líneas celulares 3X SNCA y SNCA KO tenían un menor nivel del marcador doblecortina en la SNpc control con SS (50%), indicando que se encuentran en un proceso de maduración neuronal. A pesar de esto, no se logró el desarrollo dopaminérgico eficiente, ya que los trasplantes permanecieron con una baja expresión de TH.

Cuando los trasplantes se realizaron en fase temprana de maduración dopaminérgica, la sobrevivencia de las 3 líneas celulares a 15 dpt en la mayoría de los casos fue menor en comparación al trasplante en etapa de PP, mientras que a 2 mpt ninguno de los encéfalos trasplantados con la línea celular 3X SNCA presentaba sobrevivencia. Asimismo, a 15 dpt y 2 mpt, un bajo número de células que sobrevivieron tenían expresión de TH y por lo tanto no lograron desarrollar eficientemente un fenotipo dopaminérgico terminal *in vivo*. A la par, no se observó una mejoría en el comportamiento motor.

En conclusión, la SNpc es una estructura permisiva para la sobrevivencia neuronal cuando las células son trasplantadas en etapa de PP. Sin embargo, no se observó que permita o facilite la diferenciación dopaminérgica terminal, independientemente de la etapa inicial del trasplante. De manera interesante y en contraste a lo que observamos *in vitro*, la 3X SNCA tiene un efecto negativo en la sobrevivencia celular *in vivo*, la cual fue incluso nula en los trasplantes de células de etapas más avanzadas en la diferenciación dopaminérgica.

## 2.1 Abstract

The triplication of the SNCA gene (3X SNCA) that codes for  $\alpha$ -synuclein generates an early-onset Parkinson's disease (PD), with exacerbated clinical manifestations compared to idiopathic PD, but with the same characteristic histological finding, the death of dopaminergic neurons of Substance Nigra pars compacta (SNpc), suggesting the role of this protein in the development of PD. Despite advances in the study of  $\alpha$ -synuclein in the pathological process of PD, its implications in dopaminergic differentiation are not clear. In this sense, human induced pluripotent stem cells (hiPSC) are an essential tool by allowing the modeling of PD in the mainly affected cell phenotype, the dopaminergic. Furthermore, we demonstrate that intact SNpc is a permissive niche for neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. Interestingly, when the SNpc is injured with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), dopaminergic differentiation is favored.

In order to determine if  $\alpha$ -synuclein overexpression has implications on dopaminergic potential, we used a hiPSC line from a patient with PD by the 3X SNCA (4 alleles), a hiPSC line from the patient's healthy sister without such triplication (Control, 2 alleles) and a hiPSC isogenic knockout from the 3X SNCA cell line (SNCA 4KO).

When studying them in vitro, we observed that the three cell lines are capable of developing a mesencephalic dopaminergic phenotype, characterized by the expression of Lmx1a (Control 67.56%, 3X SNCA 68.47% and SNCA KO 74.10%) and tyrosine hydroxylase (TH) (Control 24.76% , 3X SNCA 48.14% and SNCA KO 62.18%), so 3X SNCA does not seem to affect differentiation towards dopaminergic lineage in cell culture.

For their in vivo study, the cell lines were transplanted in two stages of dopaminergic differentiation, in floor plate stage (FP) (FoxA2<sup>+</sup>/ Otx2<sup>+</sup> / Lmx1a<sup>-</sup> / TH<sup>-</sup>) and in early stage of dopaminergic differentiation (LMX1<sup>+</sup>/ low expression TH) into the SNpc of rats injured with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and controls with saline solution (SS).

In FP stage, both 15 days post-transplantation (15 dpt) and 2 months post-transplantation (2 mpt), the 3X SNCA line survives with a similar percentage than the other two cell lines. Likewise, at 15 dpt the three cell lines remained with an immature neuronal phenotype ( $\beta$ -III tubulin<sup>+</sup>/ doublecortin<sup>+</sup>), while at 2 mpt the 3X SNCA and SNCA KO cell lines had a lower level of the doublecortin marker in the control SNpc with SS (50%), indicating that they are in a neuronal maturation process. Despite this, efficient dopaminergic development was not achieved, since the transplants remained with a low TH expression.

When transplants were performed in the early phase of dopaminergic maturation, the survival of the 3 cell lines at 15 dpt in most cases was lower compared to the transplants in FP stage, while at 2 mpt none of the brains transplanted with the 3X SNCA cell line showed survival. Likewise, at 15 dpt and 2 mpt, a low number of cells that survived had TH expression and therefore failed to efficiently develop a terminal dopaminergic phenotype in vivo. At the same time, no improvement in motor behavior was observed.

In conclusion, SNpc is a permissive structure for neuronal survival when cells are transplanted in the FP stage. However, it was not observed to allow or facilitate terminal dopaminergic differentiation at 2 mpt, regardless of the initial stage of transplantation. Interestingly, in contrast to what we observed in vitro, 3X SNCA has a negative effect on in vivo cell survival, which was even null in transplants with more advanced stages in dopaminergic differentiation.

## 3. Introducción

### 3.1 Enfermedad de Parkinson

Fue en 1817 cuando James Parkinson a través de 6 casos descritos en “Un ensayo sobre la parálisis agitante” [1] sentó las bases nosológicas de la enfermedad que 50 años después Jean Martin Charcot denominaría enfermedad de Parkinson (EP). Clásicamente se ha caracterizado a la EP por bradicinesia, temblor, rigidez e inestabilidad postural, signos que son cardinales pero puramente motores, aun cuando en la actualidad se reconoce que la EP conlleva una combinación tanto de signos y síntomas motores y no motores [2].

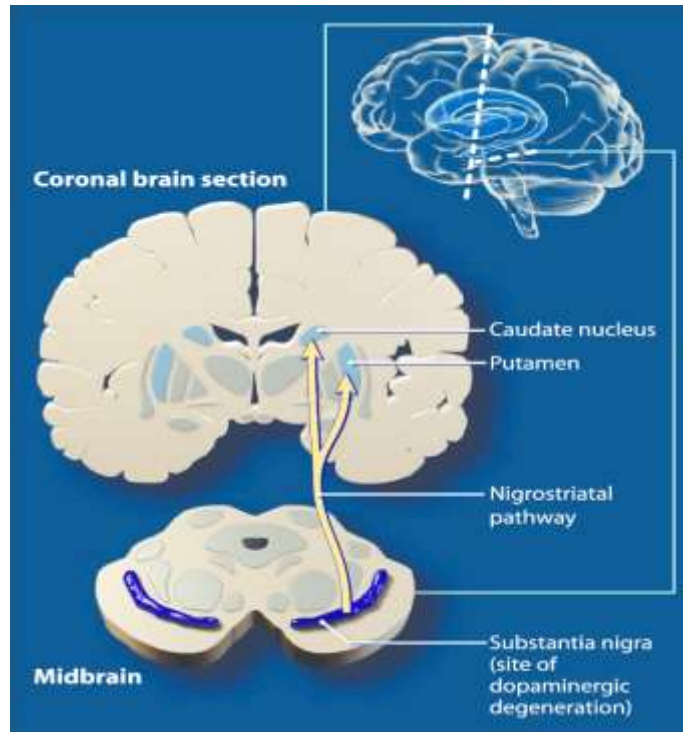
### 3.2 Epidemiología

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, sólo detrás de la enfermedad de Alzheimer [3]. A pesar de las diferencias en el diagnóstico y criterios de inclusión de los estudios epidemiológicos, un metaanálisis encontró una prevalencia global (número de casos en un momento determinado) de 0.3% en personas mayores de 40 años, la cual va incrementándose con la edad [4]. Se espera que para el año 2030 haya una población mundial de 8.7 a 9.3 millones de pacientes, el doble de los que existían en el año 2005 [5]. En México no se cuenta con estudios actuales de la prevalencia de la EP, no obstante, un estudio de 2002 realizado en la ciudad de Tepatitlán, Jalisco, encontró una prevalencia de 270 por cada 100,000 habitantes [6], cercana a la estadística mundial. Si bien, la mayoría de los casos tienen un origen idiopático, hasta 10% de los casos de la EP son de causa genética [7].

### 3.3 Histopatología

Las principales características histopatológicas de la EP son la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia *Nigra pars compacta* (SNpc) y la acumulación intracelular de  $\alpha$ -sinucleína [7]. En la fase sintomática motora de la enfermedad, la pérdida de las neuronas se restringe a la SNpc, en especial en su porción ventrolateral [8] que conduce a una disminución significativa de dopamina en el núcleo estriado al cual proyectan sus axones [9], particularmente en el putamen [10]. La muerte neuronal se va generalizando conforme la enfermedad sigue su historia natural, llegando a afectar neuronas noradrenérgicas del *locus ceruleus* [11], neuronas acetilcolinérgicas del núcleo basal de Meynert [12], neuronas glutaminérgicas del núcleo pedunculopontino [13], neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe [14], neuronas motoras del núcleo motor dorsal del vago, y neuronas subcorticales de la amígdala y el hipotálamo [15].

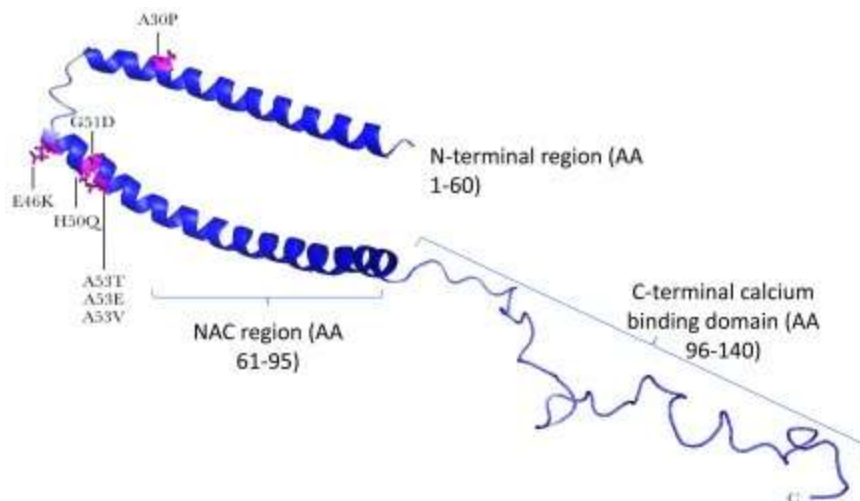
Esta degeneración dopaminérgica nigroestriatal se ha vinculado como el sustrato de las manifestaciones extrapiramidales de la EP (**Figura 1**) [16, 17]. Un estudio basado en una técnica estereológica realizado en 7 pacientes con EP, encontró que el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc estaba disminuido en un 66% en comparación a los controles, quienes tenían en promedio 550,000 neuronas dopaminérgicas [18]. Por otra parte, cuando los signos clínicos aparecen, ya hay una pérdida de por lo menos 50% de las neuronas de la SNpc y de 80% de dopamina estriatal [19].



**Figura 1. Representación de la vía nigroestriatal.** Se muestra la Sustancia Nigra pars compacta, estructura donde residen las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, cuyas proyecciones tienen como destino el núcleo caudado y putamen, pertenecientes a los núcleos basales. Tomada de [20].

### 3.4 $\alpha$ -sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos, codificada por el gen *SNCA*, localizado en el cromosoma 4 (4q22.1), tiene un peso molecular de  $\sim 15$  kDa [21] y consta de tres dominios. La región C-terminal es rica en residuos ácidos (glutamato y aspartato) y en prolina, además forma un dominio de unión a calcio, que incrementa su capacidad de unión a lípidos [22-24], la región central es conocida como componente no amiloide (NAC) y es la que permite la oligomerización de  $\alpha$ -sinucleína debido a su composición hidrofóbica [25]. Por otro lado, la región N-terminal contiene cuatro regiones de 11 repeticiones imperfectas con la secuencia consenso KTKGEV, que permiten la formación de una hélice- $\alpha$ , con la cual se puede unir a lípidos, en particular a aquellos con carga negativa (**Figura 2**) [26, 27].



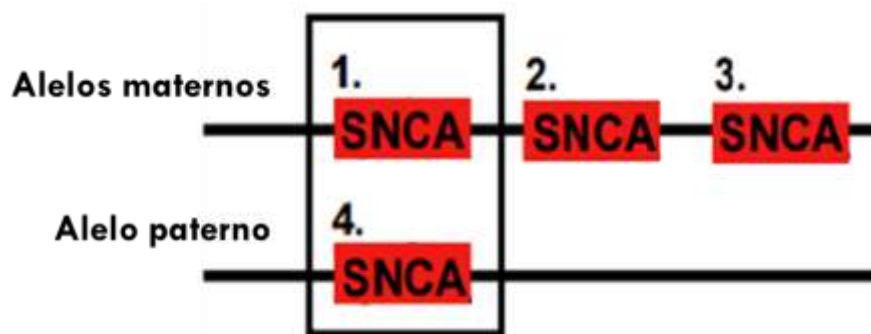
**Figura 2. Estructura de la  $\alpha$ -sinucleína.** Se muestran mediante un diagrama de cinta a las tres regiones de la  $\alpha$ -sinucleína, la región C-terminal es rica en residuos ácidos y en prolina, además, forma un dominio de unión a calcio; la región central es conocida como componente no amiloide (NAC) y permite la oligomerización de esta proteína debido a su composición hidrofóbica. Por último, la región N-terminal contiene cuatro regiones de 11 repeticiones imperfectas con la secuencia consenso KTKGEV, en las cuales se forma una hélice- $\alpha$  que se puede unir a lípidos. Así mismo, se esquematizan las mutaciones puntuales asociadas a la enfermedad de Parkinson. Tomada de [24].

La  $\alpha$ -sinucleína se encuentra fisiológicamente de manera ubicua en tejidos y órganos como sangre, médula ósea, riñón, páncreas, músculo esquelético, pulmones, corazón, placenta y cerebro [28], pero es en éste último donde se encuentra su mayor concentración, principalmente en estructuras como la SNpc, amígdala, neocorteza, hipocampo, bulbo olfatorio, núcleo estriado, tálamo y cerebelo [28, 29]. Sus principales funciones son el incremento en la velocidad de formación de microtúbulos, regulación de la fusión de vesículas presinápticas con la membrana celular, interacción con proteínas sinápticas relacionadas con la exocitosis vesicular, estabilización de complejos de la cadena transportadora de electrones [30-32].

Sus estructuras principalmente son en forma de monómeros y tetrámeros, que son solubles, pero que en condiciones patológicas como la EP, forman oligómeros que se pueden unir en protofilamentos y en última instancia fibrillas, estructuras características de los cuerpos de Lewy (CL) [31]. Los CL son inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas constituidas en su mayor parte por agregados fibrilares de  $\alpha$ -sinucleína [33] y, en menor proporción de sinfilina-1, componentes del sistema ubiquitina-proteasoma y más de 70 moléculas [34]. En la EP los CL se observan inicialmente en las neuronas monoaminérgicas y colinérgicas del tallo cerebral y del sistema olfatorio, pero en estadios más avanzados se pueden hallar en regiones neocorticales y límbicas [7].

Las mutaciones puntuales y multiplicaciones del locus del gen SNCA, causan formas heredables de la EP, indicando que la  $\alpha$ -sinucleína es un elemento clave para el desarrollo de la EP [30, 31]. Es

de relevancia clínica la triplicación del gen *SNCA* (3X *SNCA*) debido a su patrón de herencia autosómico dominante. Dicha triplicación génica es de aproximadamente 1.7 Mb, e incluye al gen *SNCA* (3X *SNCA*) y genes adyacentes. Se produjo a través de dos duplicaciones no simultáneas, dando como resultado que los portadores tengan cuatro alelos del gen *SNCA*, tres provenientes del alelo mutado y uno correspondiente al alelo no mutado (**Figura 3**) [35-37]. Los pacientes con esta mutación presentan hasta el doble de mRNA y proteína correspondiente a  $\alpha$ -sinucleína [38-40]. Clínicamente corresponde a una EP rápidamente progresiva, de inicio temprano, con signos y síntomas exacerbados con un deterioro cognitivo precoz [35, 38, 39, 41]. El poder atribuir un fenotipo determinado a una mutación caracterizada es de gran importancia, porque permite el modelamiento *in vitro* de padecimientos cuya obtención de tejido *in vivo* es complicada y con heterogeneidad de sus condiciones.



**Figura 3. Representación de los 4 alelos producto de la triplicación del gen *SNCA*.** Esquema de los 4 alelos del gen *SNCA* que tiene la línea celular 3X *SNCA* (se numera cada uno); en el alelo materno ocurrió una triplicación a través de 2 duplicaciones no simultáneas de dicho gen, dentro del recuadro con borde negro se muestra la dosis génica normal. Tomada de [41].

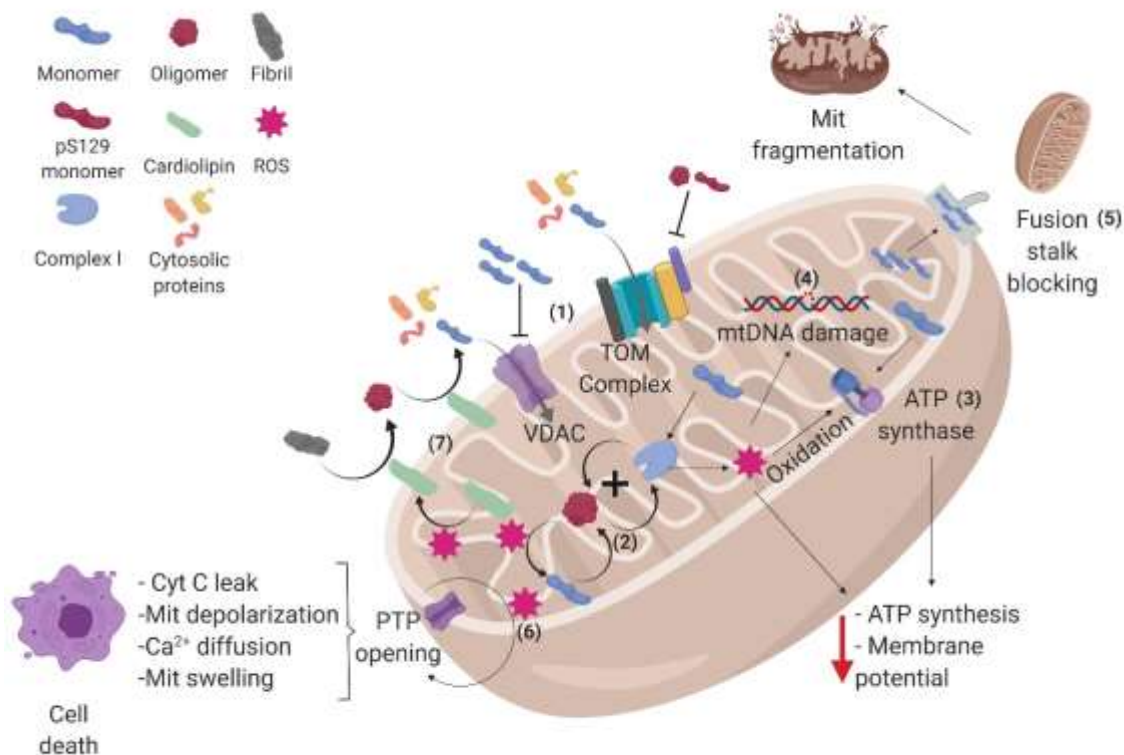
### 3.5 Fisiopatología de la $\alpha$ -sinucleína

Aun cuando la  $\alpha$ -sinucleína interacciona y tiene funciones no patológicas con la mayoría de los organelos [32], su citotoxicidad se suele atribuir a sus efectos sobre la mitocondria. Por ejemplo, la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína y la presencia de su forma oligomérica conllevan a un agotamiento en la actividad del complejo I de la cadena transportadora de electrones (CTE), que conduce a alteraciones del flujo de electrones [42], incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [43], despolarización de la membrana mitocondrial [44] y disminución de la síntesis de ATP [40].

Además, las ROS producen mayor agregación de  $\alpha$ -sinucleína y aunque los mecanismos moleculares no se comprenden completamente, se postula que los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína ante condiciones oxidativas, forman enlaces cruzados covalentes entre los residuos de tirosina, dando lugar a filamentos más grandes de  $\alpha$ -sinucleína. Dichas conformaciones de  $\alpha$ -sinucleína pueden

umentar la producción de ROS al interactuar con la CTE, lo que resulta en un ciclo donde la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y la generación de ROS se exacerban mutuamente [45, 46].

De igual manera, las ROS pueden oxidar elementos del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, con lo cual se puede estimular su apertura, culminando en muerte celular [42]. En relación a ello, existe evidencia acerca de la presencia de estrés oxidativo producto de la disfunción mitocondrial en el tejido de pacientes con EP [47], quedando por dilucidar si es un fenómeno que ocurre al inicio de la enfermedad o en estadios más avanzados [47]. Un esquema integral de los eventos fisiopatológicos en la mitocondria asociados a la EP se puede ver en la **Figura 4**.



**Figura 4. Interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con la mitocondria.** (1) Los monómeros de la  $\alpha$ -sinucleína entran a la mitocondria a través de la translocasa de la membrana externa (TOM) y del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), sin embargo, los oligómeros y la  $\alpha$ -sinucleína fosforilada en el residuo de serina 129 en TOM y la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en VDAC inhiben el importe de proteínas, afectando los procesos dependientes de proteínas citosólicas. (2) Una vez dentro, la  $\alpha$ -sinucleína puede interactuar con el complejo I de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa (3), disminuyendo los niveles de ATP, dando lugar a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la mitocondria, las ROS pueden dañar el DNA mitocondrial, disminuyendo la expresión de las proteínas codificadas en éste (4). (5) Los monómeros de  $\alpha$ -sinucleína también pueden bloquear el tallo de fusión mitocondrial, conduciendo a la fragmentación del organelo. (6) Adicionalmente, la  $\alpha$ -sinucleína puede inducir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) permitiendo la difusión de citocromo C (cyt C) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ),



además de la despolarización de la membrana, conduciendo a la apoptosis. (7) Ciertos eventos de estrés, como las ROS, pueden estimular la traslocación de cardiolipina de la membrana interna a la membrana externa, donde puede actuar para amortiguar las formas agregativas de la  $\alpha$ -sinucleína. Tomado de [32].

### **3.6 Tratamiento**

Los tratamientos disponibles para la EP tienen como objetivo mejorar la capacidad funcional del paciente durante el mayor tiempo posible, a pesar de esto, no modifican la evolución del proceso neurodegenerativo [48]. La terapéutica farmacológica actual se basa en controlar la sintomatología con medicamentos que aumentan las concentraciones intracerebrales de dopamina, como la levodopa, o en estimular directamente sus receptores, como el pramipexol [7, 8]. Sin embargo, más del 80% de los pacientes en tratamiento con levodopa por más de 10 años experimentan complicaciones motoras asociada a su uso, que incluyen oscilaciones en la respuesta motora y discinesias que pueden llegar a ser más incapacitantes que la propia enfermedad [7, 8, 49, 50].

### **3.7 Pronóstico**

Una revisión sistemática de 9 estudios de cohorte con un seguimiento medio de 9 años, concluyó que existe un mayor riesgo de mortalidad con respecto a los controles, (52%, con un 95% de intervalo de confianza (IC), par de números entre los cuales se estima que estará un valor desconocido a un nivel de confianza dado, 1.25-1.78) [51]. Por otra parte, un estudio prospectivo de cohorte encontró una mortalidad por cualquier causa de 55% y una supervivencia libre de demencia o inestabilidad postural de 23% a 10 años del diagnóstico [52]. Es de destacar que la supervivencia media después del diagnóstico es de 9.1 años (95% CI, 7.4-10.9 años) [53].

Dado que el uso de fármacos actuales y el pronóstico a largo plazo son desalentadores, se han buscado otros abordajes terapéuticos como el trasplante de células troncales para mitigar las manifestaciones clínicas de la EP [8]. El fundamento de esta perspectiva es el remplazo del tejido degenerado durante la historia natural de la enfermedad, a través de un trasplante que logre integrarse al tejido endógeno y liberar dopamina en sitios diana, para que de esta forma se pueda aminorar la causa subyacente de las manifestaciones motoras. Este trasplante celular debe de tener las características fenotípicas de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que se puede lograr mediante el uso de diversos protocolos de diferenciación celular.

### **3.8 Células troncales**

Las células troncales son aquellas células que tienen la capacidad de autorrenovarse y de generar progenie diferenciada hacia determinado fenotipo [54]. La autorrenovación es la capacidad para proliferar sin la pérdida del potencial de diferenciación y sin experimentar senescencia. Estas células pueden dividirse simétricamente y asimétricamente [55].

- Simétricamente: ambas células hijas son células troncales o dan lugar a células no troncales (diferenciadas).
- Asimétricamente: dan lugar a una célula troncal y una célula no troncal.

Dependiendo de su potencial de diferenciación las células troncales pueden clasificarse en [56]:

- Totipotentes: Aquellas células capaces de dar origen a todos los tipos celulares de un organismo y células extraembrionarias, ej. Placenta.
- Pluripotentes: Células que pueden dar origen a cualquier célula de las 3 capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo).
- Multipotentes: Células que sólo pueden dar origen a células de una capa germinal.
- Unipotentes: Células que únicamente pueden dar origen a un tipo celular.

Debido a que pueden diferenciarse a cualquier fenotipo celular de las tres capas embrionarias, las células troncales pluripotentes tienen un papel central en la medicina regenerativa, ya que permiten estudiar una gran variedad de procesos del desarrollo y regeneración. Asimismo, son una fuente para el modelado de enfermedades, cribado de fármacos y terapia de reemplazo celular [57, 58].

### 3.9 Células troncales pluripotentes: Embrionarias e inducidas

Existen dos tipos principales de células troncales pluripotentes, las células troncales embrionarias (ESC) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) [59].

Las ESC son aquellas que derivan de la masa celular interna del blastocisto preimplantado, lo que sucede entre los días 5-7 después de la fertilización. A lo largo del desarrollo embrionario darán lugar a todas las estructuras definitivas del feto [60]. Fueron aisladas por primera vez en ratón en 1981 [60] y en humano (hESC) en 1998 [61]. Posteriormente, se determinó que para mantener su estado de pluripotencia, las ESC expresan varias proteínas clave, como *octamer-binding protein 4* (Oct4), SRY (*sex determining region Y*)-box 2 (Sox2) y Nanog. Además, existen en un estado de inactivación pre-X, con ambos cromosomas X activos en células femeninas [62].

La relevancia de las hESC en terapias de reemplazo celular radica en que son capaces bajo determinados protocolos de cultivo, de dirigirse a diferentes fenotipos celulares, entre ellos el dopaminérgico [63-67] por lo que son una herramienta valiosa en el estudio de la EP.

Sin embargo, a pesar de su utilidad, su aplicación clínica se encuentra limitada por restricciones administrativas y legales en relación a su obtención a partir de embriones humanos [68]. Otra desventaja de su uso en humanos es que representan un recurso alogénico, y por lo tanto, pueden provocar una respuesta inmunológica desfavorable [69]. Estas limitaciones llevaron a la creación

de una nueva fuente celular que comparte características similares de pluripotencia a las ESC: las iPSC.

Por primera vez en el año 2006 se publicaron resultados exitosos de la generación de iPSC provenientes de ratón [70] y en 2007 de humano (hiPSC) [58], a partir de células somáticas, mediante la coexpresión de 4 factores de transcripción relacionados con pluripotencia. Para las dos especies, los factores mínimos necesarios de pluripotencia fueron: *octamer-binding protein 3/4* (OCT3/4), *SOX2*, *Krüppel-like factor 4* (KLF4) y *MYC* (denominados colectivamente como OSKM). Paralelamente, el equipo del Dr. Thomson en la universidad de Wisconsin tuvo resultados similares usando los factores OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 [71].

Para poder dirigir estas células troncales pluripotentes (hESC y hiPSC) hacia un fenotipo celular determinado, en nuestro caso hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, que residen en la SNpc [64], es importante conocer las señales moleculares y celulares que ocurren durante el desarrollo embrionario, con la finalidad de poder reproducir tales eventos para el modelamiento de la EP.

### 3.10 Diferenciación dopaminérgica mesencefálica en el desarrollo embrionario

En ratón las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas inician su desarrollo en el día embrionario (E) E7.5 y termina en E10.5 [72] [73], mientras que en el humano empiezan su formación en la semana 5 de gestación y alcanzan su pico, aproximadamente en la semana 10-11 [74, 75] (**Figura 5**).

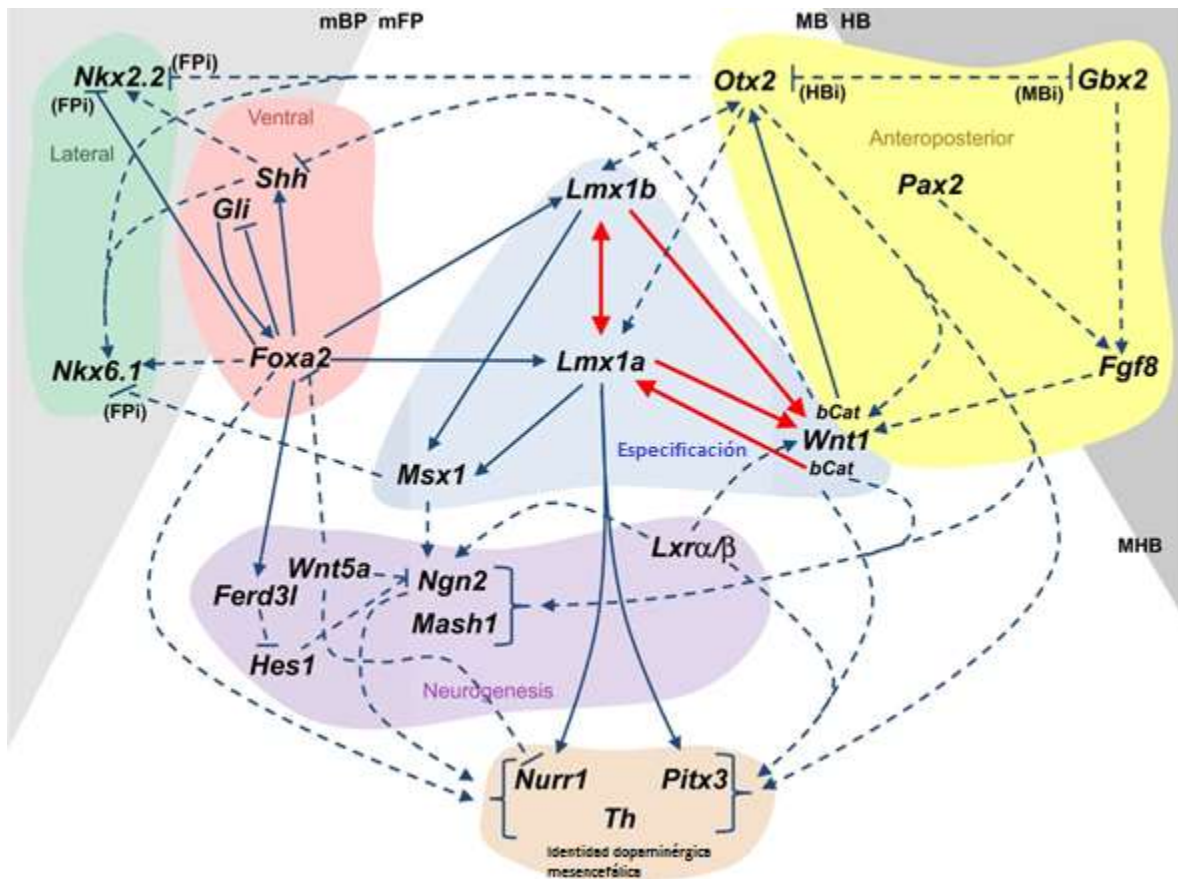
Conforme se desarrolla el tubo neural, surgen 2 centros de señalización importantes para la formación de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, el primero es el organizador del istmo (Odl) (E7.5) [72], que limita al mesencéfalo con el rombencéfalo y el segundo la placa de piso (PP) que va a dar lugar a las estructuras con identidad ventral [76].

El Odl se va a formar en el sitio donde se encuentran y reprimen mutuamente los factores de transcripción (FT) *Otx2* (homólogo de ortodentículo 2) en el mesencéfalo [77] y el FT *Gbx2* (homeocaja 2 de gastrulación cerebral) en el rombencéfalo [78], *Otx2* va a regular la expresión de *Wnt1* (proteína proto-oncogénica *Wnt-1*) en el mesencéfalo [79], en tanto que *Gbx2* mantendrá la inducción de *FGF8* (factor de crecimiento fibroblástico 8) generada por *Pax2* (homeosecuencias emparejadas-2) [80]. Estas interacciones van a formar un patrón anteroposterior para la formación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas [64].

La PP se forma a partir de la especificación de la parte más ventral del tubo neural por parte de la notocorda a través del morfogéno homólogo *Sonic hedgehog* (*Shh*) y va a expresar el FT *FoxA2* (proteína A2 de la caja de pinza) (E8) [81]. Posteriormente (E8.5), la PP empezará a expresar *Shh* por sí misma, lo que formará un gradiente necesario para el establecimiento del eje ventro-dorsal [82, 83].

La especificación de las células de la PP en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se da por la regulación de FoxA1/2 y Otx2 sobre los FT Lmx1b (homeocaja 1 beta asociado a LIM) y Lmx1a (homeocaja 1 alfa asociado a LIM) [84, 85]. Estos últimos van a regular positivamente la expresión de genes como NURR1 (Nr4a2, receptor nuclear 4a2) y Pitx3 (homeocaja pituitaria 3) que subsecuentemente regulan la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), enzima que cataliza la reacción limitante en la síntesis de dopamina [86-89]. NURR1 y Pitx3 son también necesarios para la sobrevivencia y diferenciación de los precursores dopaminérgicos, toda vez que en ratones *knockout* para alguno de estos 2 FT se reduce dramáticamente el número de neuronas dopaminérgicas en el nacimiento [90-92].

Así mismo, NURR1 regula la expresión de genes característicos de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, como Vmat2 (transportador vesicular 2 de monoaminas) y DAT (transportador de dopamina) [93-95]. De manera interesante, se ha observado *in vitro* que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína puede causar regulación negativa de genes implicados en la diferenciación dopaminérgica (NURR1, GIRK-2 y TH) [39], llevando probablemente a una disminución en el número de células generadas con este fenotipo.



**Figura 5. Relación de factores de transcripción implicados en la generación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.** El sitio donde se encontrarán las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas está delimitado a nivel rostro-caudal por el lugar donde las señales de Otx2 (homólogo de ortodenticulo 2) y Gbx2 (homeocaja 2 de gastrulación cerebral) se encuentran e inhiben mutuamente. El patrón ventro-

dorsal se da a partir del gradiente del morfogéno Shh (homólogo Sonic hedgehog) que surge de la notocorda y de la especificación de la placa de piso a partir del tubo neural y que va a expresar FoxA2 (proteína A2 de la caja de pinza). FoxA2 y Otx2 estimulan la expresión de Lmx1a/b (homeocaja 1 alfa/beta asociado a LIM), que a su vez van a definir el fenotipo dopaminérgico mesencefálico a través de la expresión de factores como NURR1 (Nr4a2, receptor nuclear 4a2), Pitx3 (homeocaja pituitaria 3) y TH (tirosina hidroxilasa). Tomado de [64].

### 3.11 Diferenciación dopaminérgica *in vitro*

El aumento en la comprensión de las bases celulares y moleculares implicadas en la diferenciación dopaminérgica *in vivo* ha incrementado el interés por recrear dichas condiciones *in vitro* con la intención de desarrollar neuronas dopaminérgicas, que sirvan para el modelamiento de enfermedades, prueba de fármacos e incluso como terapia regenerativa. Para este fin los principales enfoques empleados son la diferenciación dopaminérgica a través de estructuras neuroepiteliales y la diferenciación dopaminérgica inducida mediante el uso de moléculas pequeñas (**Figura 6**) [64, 96].

#### 3.11.1 Diferenciación dopaminérgica a través de estructuras neuroepiteliales

##### 3.11.1.1 Inducción dopaminérgica a través de células alimentadoras estromales:

El cocultivo de células troncales pluripotentes con células alimentadoras (células MS-5 [38], S2 [97] o PA6 [98]) en medio suplementado con Noggin da lugar a la formación de precursores neurales en estructuras neuroepiteliales conocidas como “rosetas neurales”. Estas pueden ser disociadas en células individuales y con la exposición al factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), Shh, FGF8, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y ácido ascórbico (AA) se diferencian en precursores dopaminérgicos. Estos precursores finalmente maduran hacia un fenotipo dopaminérgico mesencefálico con el uso del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), BDNF, AA, dibutilil adenosín monofosfato cíclico (dbcAMP) y el factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- $\beta$ 3) [38, 96, 98]. Con este enfoque se han reportado resultados heterogéneos que van desde un 15% hasta 80% de células TH positivas (TH<sup>+</sup>) [38, 97, 98] (**Figura 6 A**).

##### 3.11.1.2 Neuronas dopaminérgicas derivadas de cuerpos embrioides

Las células troncales pluripotentes en estadio de colonia son despegadas de la matriz y colocadas en cultivos no adherentes con medio suplementado con FGF2, con lo que se forman estructuras tridimensionales conocidas como cuerpos embrioides (CE), que poseen células de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo [99]). Sin embargo, ante la presencia de FGF2 y suplemento N2 en cultivos adherentes, los CE se neuralizan adquiriendo una citoarquitectura de “rosetas neurales”.

Una de las bondades de este enfoque radica en que los precursores neuronales de las “rosetas neurales” disociadas pueden expandirse con el uso del factor inhibidor de la leucemia (LIF) y FGF2. Estos precursores neuronales en un medio con Shh y FGF8 dan lugar a precursores dopaminérgicos, que maduran en neuronas dopaminérgicas en medio que contenga GDNF, BDNF, TGF- $\beta$ 3, AA y

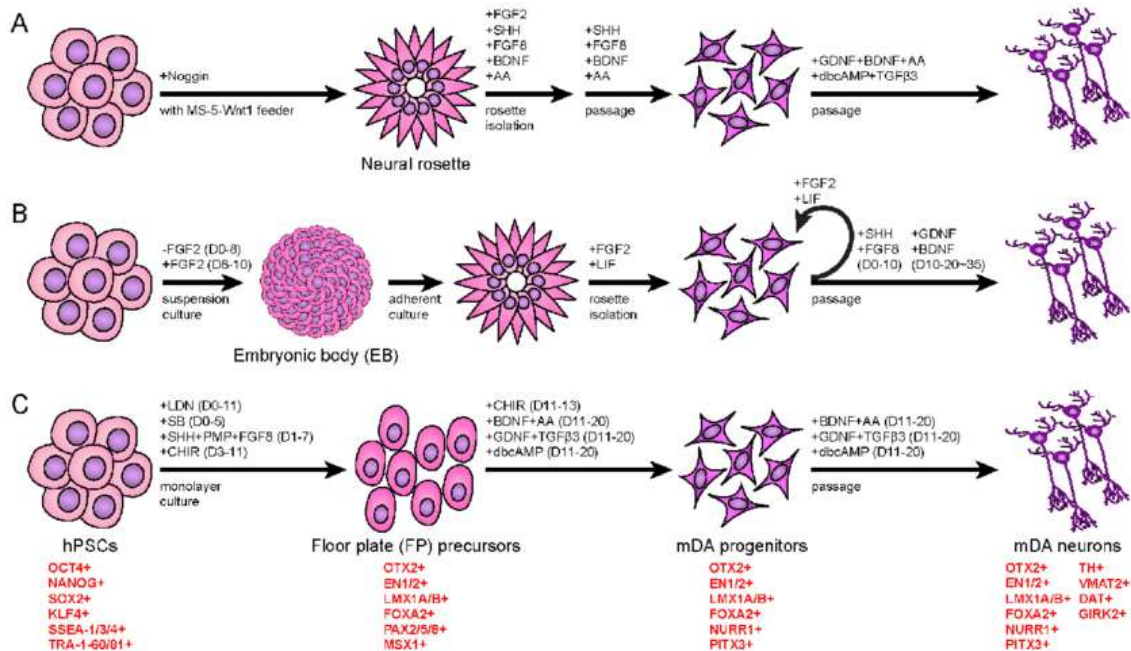
dcAMP [96, 100-102]. Mediante este enfoque se han reportado resultados heterogéneos en el número de células TH<sup>+</sup>, que van desde el 30% hasta el 80% [39, 100-104] (**Figura 6B**).

### 3.11.2 Diferenciación inducida mediante el uso de moléculas pequeñas

Mediante la combinación de 2 moléculas pequeñas (**Figura 7 C**) (familia de las LDN, familia LB y Noggin) se logra la inhibición dual de la vía SMAD (principal vía de señalización de los ligandos del factor de crecimiento transformante  $\beta$  [105]), produciendo la neuralización de las células troncales, ya sean ESC o hiPSC. Con el empleo de Shh/FGF8/purmorphina se persigue una actividad ventralizadora para un fenotipo mesencefálico de PP [82, 83, 106], como se comentó en la **Figura 5**. Posteriormente, se emplea la molécula CHIR, inhibidor de GSK3- $\beta$  y por lo tanto activador de la vía de WNT, con lo que se logra la expresión de Lmx1a [64, 86] y se incrementa la sobrevivencia celular [106].

Posteriormente, el uso de CHIR y moléculas de la familia de LDN permiten expandir el número de células de PP, al mismo tiempo que se incrementa la especificación de dichas células, con lo que disminuye la probabilidad de producir tumores al trasplantar las células ya que el remanente celular en estado pluripotente es menor. Asimismo, las células de PP se pueden criopreservar, con lo que se evita tener que especificarlas de nuevo a partir de células pluripotentes [64, 106].

Finalmente, con el uso del BDNF, AA, adenosín monofosfato cíclico (cAMP), GDNF, TGF- $\beta$ 3 y DAPT, las células pasan de ser de PP para adquirir un fenotipo maduro de neurona dopaminérgica mesencefálica. Con este tipo de protocolos se puede lograr desde un 50% hasta un 80% de células TH<sup>+</sup> con características electrofisiológicas indistinguibles de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas [106-108]. Hasta el momento, con este protocolo se logran resultados más reproducibles, eficientes y en un menor tiempo para la obtención del linaje dopaminérgico.



**Figura 6. Métodos para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas a partir de células troncales.** Son dos las principales aproximaciones usadas para lograr un alto porcentaje de células dopaminérgicas. La primera es la diferenciación dopaminérgica a través de estructuras neuroepiteliales, la cual se puede conseguir con la inducción dopaminérgica mediante células alimentadoras estromales (A) o usando la diferenciación de células de cuerpos embrioides (B). La segunda aproximación es la diferenciación inducida usando moléculas pequeñas (C). Tomado de [96].

### 3.12 Reemplazo con células troncales en la enfermedad de Parkinson

En la EP se ha estudiado el trasplante de diferentes tipos celulares que se han trasplantado en modelos animales de la EP. Entre ellos se encuentran las células cromafines de la medula suprarrenal, el tejido mesencefálico ventral fetal humano (hfVM), las células del cuerpo carotideo, el epitelio pigmentado retiniano humano, hESC y hiPSC. Siendo el tejido hfVM, las hESC y hiPSC las que han mostrado capacidad de diferenciarse eficientemente *in vitro* en neuronas dopaminérgicas [109].

En pacientes con EP, se ha seleccionado el núcleo estriado como sitio para albergar los trasplantes celulares porque es donde las proyecciones axónicas provenientes de la SNpc liberan dopamina. En este sentido, el tejido hfVM ha mostrado beneficios discretos pero significativos en el contexto de la sintomatología, de la captación de radiotrazadores por el núcleo estriado y de la disminución del uso de medicamentos en la EP [110-114], aunque existe evidencia controversial de sus efectos en ensayos clínicos aleatorizados, pues no se alcanzó mejoría significativa en la gravedad de la enfermedad [109, 115, 116]. Así mismo, en los estudios que han usado tejido hfVM se encuentra heterogeneidad en la selección de pacientes, el estadio de las células trasplantadas e incluso el régimen de inmunosupresión [109], por lo que la obtención de conclusiones se torna complicado.

De manera paralela, el trasplante de neuronas dopaminérgicas derivadas de hESC y hiPSC han sido investigadas como tratamiento en primates no humanos, mostrando supervivencia y funcionalidad a largo plazo [117, 118]. A partir del año 2018 se han empezado a reclutar pacientes para ensayos clínicos aleatorizados empleando hESC [119], pero hasta la fecha de escritura de esta tesis no se han reportado resultados preliminares.

### 3.13 La SNpc como sitio blanco de trasplante celular

Un paso importante para el desarrollo de terapias de reemplazo celular en la EP se centra en identificar regiones que permitan la diferenciación neuronal. Por lo que la SNpc cobra relevancia, debido a que es el sitio ontogénico de las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el núcleo estriado. En este sentido, nuestro grupo de investigación demostró que células de CE trasplantadas en la SNpc de rata eran capaces de diferenciarse a neuronas maduras, por lo tanto a la SNpc se le puede considerar un nicho neurogénico “silencioso” [120]. Paralelamente, en estudios experimentales en ratas realizados por Grealish *et al.* [63] se describió que neuronas dopaminérgicas derivadas de ESC y de tejido hfVM trasplantadas en la SNpc eran capaces de sobrevivir y generar proyecciones axónicas a regiones estriatales. Respecto a los trasplantes

realizados en humanos, en Canadá en el año 2005, se reportó el trasplante de tejido hFVM en el núcleo estriado y en la SNpc de un paciente con EP; se implantaron aproximadamente 500,000 células en esta última localización. 4.4 años después el paciente falleció y en el estudio *post mortem* se observó de 4-8% de células TH<sup>+</sup>, número menor al hallado en el trasplante putaminal que fue de 15-30%. Los autores sugieren que pueden existir diferencias en la supervivencia dependiendo de factores y condiciones regionales a la zona del trasplante [121].

Esta evidencia muestra que las células trasplantadas en la SNpc pueden sobrevivir e incluso diferenciarse a neuronas dopaminérgicas, quedando por determinar si células con mutaciones génicas asociadas a un fenotipo específico son capaces de tener resultados similares.

### 3.14 Células con triplicación del locus del gen SNCA como modelo de la EP

En el año 2009 se generaron hiPSC mediante el uso de vectores retrovirales que expresaban los factores OSKM en fibroblastos dérmicos provenientes de un paciente de 42 años que padecía la EP por 3X SNCA [122]. Desde entonces estas células han servido para el modelaje de la EP, ya que tienen hallazgos histopatológicos semejantes a lo vistos a las formas idiopáticas, dando lugar al incremento del entendimiento del papel de la  $\alpha$ -sinucleína en el desarrollo de la enfermedad [38-40, 123], así como para el cribado de fármacos [124].

Las principales características a nivel celular de la línea 3X SNCA de humano son fibroblastos sin niveles detectables de  $\alpha$ -sinucleína [123], precursores neuronales con alteración del metabolismo energético y aumento de ROS [40]. Así mismo, las neuronas muestran un aumento del doble de mRNA de  $\alpha$ -sinucleína [123], reducción del crecimiento de neuritas y redes neuronales [39] e incremento en la secreción de  $\alpha$ -sinucleína [125]. Cuando se expone a las neuronas dopaminérgicas derivadas de la línea celular hiPSC con 3X SNCA a situaciones de estrés oxidativo, muestran un incremento de hasta cuatro veces en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la agregación proteica, que culminan en una mayor tendencia a la muerte celular [38].

Con la finalidad de estudiar las implicaciones de la  $\alpha$ -sinucleína sobre el desarrollo del fenotipo dopaminérgico, estas hiPSC portadoras de la 3X SNCA, se han diferenciado usando un protocolo de roseta neural, teniendo aproximadamente 12% de células TH<sup>+</sup> [38], mientras que pueden alcanzar el 50% de células TH<sup>+</sup> con un protocolo de diferenciación inducida mediante el uso de moléculas pequeñas [123]. Al final de este último protocolo presenta un fenotipo FoxA2<sup>+</sup>/Otx2<sup>+</sup>/Lmx1a<sup>+</sup> en etapa de PP y FoxA2<sup>+</sup>/TUJ1<sup>+</sup>/TH<sup>+</sup>, lo que indica un fenotipo dopaminérgico mesencefálico [126]. En estos estudios no se reportó diferencia estadística en el número de neuronas TH<sup>+</sup> [38, 123] ni en la cantidad de RNA mensajero para TH cuando se comparó contra células control (2 alelos del gen SNCA) [41].

En contraste, Oliveira *et al.* [39] encontraron una disminución significativa en el número de neuronas TH<sup>+</sup> derivadas de la línea celular 3X SNCA, que se correlacionó con una baja expresión de genes asociados con la diferenciación neuronal (DLK, GABBR2, NURR1 y TH). De manera similar, se



reportó que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína humana en cultivos primarios de mesencéfalo ventral tiene un efecto de regulación negativa sobre genes asociados a la diferenciación dopaminérgica (Pitx3, NURR1 TH, Vmat2 y DAT), que se asoció a una degeneración neuronal dopaminérgica en días posteriores del cultivo (día 15, estadio de neurona dopaminérgica diferenciada) [127]. Resultados similares fueron replicados *in vivo* por Decressac *et al.* en 2012 [128].

### 3.15 Generación de la línea celular *knockout* isogénica de 3X SNCA

Si bien es importante entender los efectos de la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína mediada por la 3X SNCA sobre las neuronas dopaminérgicas, es igualmente necesario conocer las implicaciones de su ausencia. Con este fin, nuestros colaboradores del Instituto de Parkinson en Sunny Valley, CA, generaron una línea celular *knockout* del gen SNCA. Para ello, emplearon el sistema de edición génica CRISPR/Cas9 con una guía de RNA sobre el exón 2 de cada uno de los 4 alelos del gen SNCA de la línea celular 3X SNCA, lo que permitió eliminar la expresión de los 4 alelos del gen.

La transfección con las nucleasas se realizó 3 veces secuencialmente durante 6 semanas con la intención de aumentar la eficacia. Los conjuntos transfectados se secuenciaron para detectar la presencia de deleciones o inserciones de nucleótidos (*indels*), lo que indica la reparación a través de recombinación no homóloga en los sitios de corte. Las clonas se evaluaron inicialmente para alelos *knockout* utilizando PCR (reacción en cadena de polimerasa). La línea celular resultante *knockout* isogénica (SNCA KO) tuvo los siguientes *indels* en los alelos de dicho gen [41]:

- Delección de 5 pares de bases (pb)
- Delección de 26 pb
- Delección de 8pb
- Inserción de 14pb

Cuando esta línea celular, SNCA KO, se somete a un protocolo de diferenciación inducida mediante el uso de moléculas pequeñas, adquiere un fenotipo FoxA2<sup>+</sup>/Nestina<sup>+</sup> (marcador de precursores neurales) de PP, similar a la línea celular control (2 alelos del gen SNCA). Aunque la expresión de FoxA2 y TH cualitativamente disminuye al final del protocolo (faltando la cuantificación) [41], lo que podría interpretarse en que la expresión de  $\alpha$ -sinucleína es necesaria para la maduración de las células de PP hacia un fenotipo dopaminérgico mesencefálico y, que estaría en concordancia con el resultado reportado por Tarasova *et al.* en 2018, acerca de que la  $\alpha$ -sinucleína es necesaria para la formación de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la SNpc [129].

Basados en estos antecedentes, el daño de la  $\alpha$ -sinucleína y sus diferentes conformaciones sobre neuronas ya diferenciadas se encuentra parcialmente caracterizado en el contexto de la EP. El hecho de que la evidencia sobre la relación de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína con la diferenciación dopaminérgica sea heterogénea, indica que son necesarios nuevos estudios; particularmente se desconoce si el papel fisiopatológico de la  $\alpha$ -sinucleína puede estar implicado desde etapas tempranas del desarrollo. Por tal motivo el objetivo de este estudio es determinar

las implicaciones *in vitro* e *in vivo* de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína sobre el desarrollo del fenotipo dopaminérgico mesencefálico, el principalmente afectado en la EP.

## 4. Justificación

La EP es una padecimiento crónico-degenerativo, con alta morbimortalidad y elevados índices de discapacidad. La relación entre la acumulación y agregación de la  $\alpha$ -sinucleína con la patología de la EP tanto de origen idiopático como genético está bien caracterizada, en especial en el fenotipo dopaminérgico mesencefálico. Sin embargo, se desconoce si los efectos negativos se presentan desde etapas tempranas del desarrollo. Aunado a lo anterior, los tratamientos actuales no modifican la historia natural de la enfermedad y se limitan a la restitución de los niveles de dopamina en los ganglios basales a través de la administración exógena de levodopa, no obstante, su eficacia disminuye con el tiempo. En este sentido las hiPSC con mutaciones génicas asociadas a la EP cobran relevancia ya que al diferenciarse a neuronas dopaminérgicas mesencefálicas presentan hallazgos histopatológicos equiparable a dicha enfermedad por lo que se puede realizar el estudio de las implicaciones de la  $\alpha$ -sinucleína sobre el desarrollo de este fenotipo, con la intención de identificar marcadores tempranos de la enfermedad e incluso nuevos blancos terapéuticos. Así mismo, las células dopaminérgicas mesencefálicas derivadas de las hiPSC con o sin mutación podrían ser una opción viable de tratamiento al suplir la función de las neuronas degeneradas de la SNpc, dando como resultado una mejoría sostenida en la sintomatología motora.

## 5. Hipótesis

El trasplante de hiPSC con triplicación del locus del gen SNCA en etapa de PP y de neuronas dopaminérgicas inmaduras tendrá la capacidad de sobrevivir y el potencial para diferenciarse a neuronas dopaminérgicas maduras en la SNpc.

## 6. Objetivo general

Determinar si la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína tiene implicaciones sobre el potencial dopaminérgico de la línea celular 3X SNCA trasplantada en dos estadios de diferenciación dopaminérgica en la SNpc en un modelo *in vivo* de la EP.

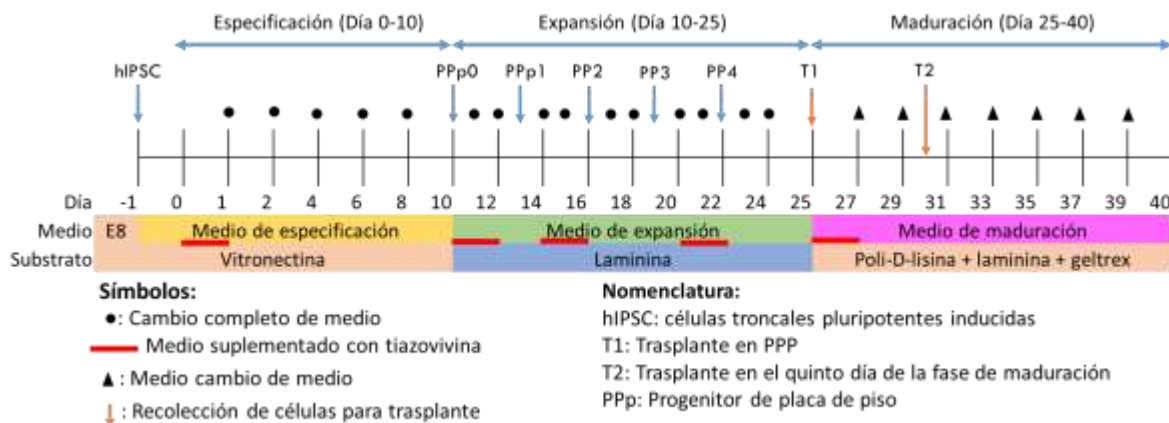
## 7. Objetivos particulares

1. Determinar el potencial dopaminérgico de las líneas celulares 3X SNCA (triplicación del gen SNCA), Control (línea Control, 2 alelos del gen SNCA) y SNCA KO (*knockout* para el gen SNCA) en cultivo.

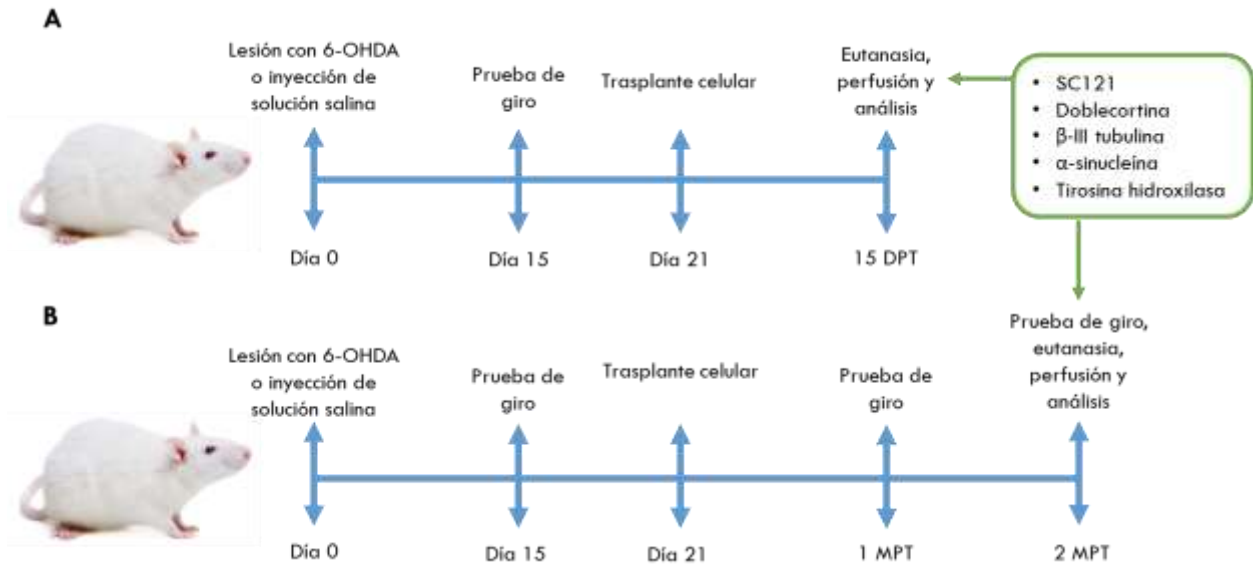
2. Caracterizar el potencial dopaminérgico de las líneas celulares 3X SNCA, Control y SNCA KO, trasplantadas en las fases de PP, quinto y decimoquinto día de diferenciación en la SNpc de ratas, a corto y largo plazo.
3. Cuantificar cambios en el comportamiento motor de las líneas celulares 3X SNCA, Control y SNCA KO, trasplantadas en fase de PP y quinto día de la fase de diferenciación en la SNpc de ratas a corto y largo plazo.

## 8. Materiales y Métodos

La estrategia experimental consta de 2 fases de desarrollo para cada grupo. La primera relacionada con cultivo celular mediante el protocolo de diferenciación dopaminérgica de hiPSC (**Figura 8**) y la segunda consistente en la generación y seguimiento del modelo experimental de la EP en ratas (**Figura 9**).



**Figura 8. Línea temporal del protocolo de diferenciación dopaminérgica de las líneas celulares (Control, 3X SNCA, SNCA KO).** Cada línea celular pasa por 3 fases para desarrollar un fenotipo dopaminérgico: especificación, expansión y maduración. Las flechas azules señalan los pasajes de las células de placa de piso (PP), a su vez las flechas naranjas indican el día en el cual las células son recolectadas para ser trasplantadas. Los trasplantes se realizan en etapa de PP y en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica.



**Figura 9. Línea temporal para la generación del modelo experimental y trasplante.** 15 días posteriores a la lesión con 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) se realizó una prueba de giro con amfetamina. Las ratas con más de 400 giros ipsilaterales a la lesión fueron trasplantadas con la línea celular según correspondía. **(A)** Las ratas fueron valoradas con respecto a la sobrevivencia del trasplante y marcadores de diferenciación dopaminérgica a 15 días post-trasplante (DPT). **(B)** Las ratas destinadas a 2 meses post-trasplante (MPT), tuvieron adicionalmente a dos pruebas de giro: 1 DPT y previo a la eutanasia, para valorar cambios en el comportamiento motor. Tanto para **(A)** como **(B)** se usaron los siguientes marcadores: SC121 (marcador de células de humano), doblecortina, β-III tubulina, α-sinucleína y tirosina hidroxilasa.

## 8.1 Cultivo celular

### 8.1.1 Descripción General

Para lograr la diferenciación dopaminérgica se utilizó el protocolo modificado de diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de células pluripotentes “PSC Dopaminergic Neuron Differentiation Kit” (**Figura 8**) [41, 126, 130], que proporciona condiciones de cultivo reproducibles, un tiempo de diferenciación más corto (40 vs. 80 días) y un alto número de neuronas dopaminérgicas funcionales (hasta 80%) [106, 126]. Las líneas celulares utilizadas fueron una línea de hiPSC proveniente de un paciente con EP por la 3X SNCA (4 alelos), una línea de hiPSC proveniente de la hermana sana del paciente sin dicha triplicación (Control, 2 alelos) y una hiPSC *knockout* para los 4 alelos, isogénica de la línea celular 3X SNCA (SNCA 4KO).

Primeramente, las hiPSC se inducen en medio de especificación para formar células de PP. A continuación, se expanden como cultivos adherentes en medio de expansión de células de PP, finalmente, se diferencian en neuronas dopaminérgicas maduras en medio de maduración de neuronas dopaminérgicas. Para su diferenciación las células son mantenidas en una incubadora con una atmósfera humidificada (95% aire, 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. En cada pasaje celular el medio se suplementó con tiazovivina 1 μM (Stemgent, 04-0017) con el propósito de aumentar la sobrevivencia celular.

### 8.1.2 Especificación (Día 0-10):

El primer paso de la diferenciación de neuronas dopaminérgicas fue la especificación de hiPSC en células de PP, en medio de especificación (Medio Neurobasal, Gibco, 21103049 más suplemento de especificación de PP, Gibco, A3146801) sobre pozos cubiertos con vitronectina (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Gibco, A14700). Las células especificadas de PP se recolectaron el día 10 para iniciar la etapa de expansión. Los cultivos celulares se realizaron sobre portaobjetos con cámara de 8 pozos (Thermo Scientific, 154941) para su análisis mediante inmunofluorescencia y en cajas de cultivo con 6 pozos (Thermo Scientific, 140675) para ser trasplantadas en los encéfalos de ratas.

### 8.1.3 Expansión (Día 10-25):

El segundo paso de la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas fue la expansión de células de PP en cultivos adherentes en medio de expansión (Gibco, A3165801) en pozos de cultivo revestidos con laminina (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Gibco, 23017015), que aumenta el número de células y mejora la eficiencia de la diferenciación hacia las neuronas dopaminérgicas. Se pueden realizar hasta 10 pasajes sin que exista variación en la expresión de marcadores dopaminérgicos [130]. Se realizó el pasaje los días 13 (PP1), 16 (PP2), 19 (PP3) y 22 (PP4), y en el día 25 que correspondería al pasaje número 5 se recolectaron las células para ser trasplantadas o para pasar a la fase de maduración. Una parte de las células en PP2 se congelaron para crear un banco de células para uso futuro, mientras que el resto se utilizó para los siguientes pases.

### 8.1.4 Maduración (Día 26-40):

El último paso de la diferenciación dopaminérgica fue la maduración de las células de PP en neuronas dopaminérgicas maduras en medio de maduración (DMEM-F12 (Gibco, 10565018) con suplemento de maduración (Gibco, A3147401)) en pozos de cultivo con triple capa de poli-D-lisina (10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Sigma, p7280), geltrex (10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Thermo Fisher Scientific, A1413202) y laminina (1.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , Gibco, 23017015). Si bien esta etapa dura quince días, nosotros realizamos el trasplante celular en el quinto día para estudiar si alcanzaban la maduración dopaminérgica *in vivo*.

## 8.2 Preparación celular para trasplante

Recolección de células:

1. Se trasplantan células a partir de cultivos con 100% de confluencia (muy compactos).
2. Se aspiró el medio de los pozos y se enjuagó con buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS) (1ml) para eliminar cualquier resto de medio. Se realizó 2 veces.
3. Se añade acutasa (1 ml/10  $\text{cm}^2$ , Gibco, A11105) e incubó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, observando continuamente los pozos para el desprendimiento de células.
4. Después de que el 80% de las células se desprendieron (aproximadamente a los 5-10 minutos), transferimos la suspensión de células a un tubo estéril de cultivo de 15 ml con 5 ml de DPBS previamente añadido.

5. Se enjuagan los pozos 3 veces con 1 ml DPBS y se colocan en el mismo tubo de cultivo de 15 ml, para asegurar la recuperación de todas las células, resuspendiendo gentilmente para crear una concentración homogénea.
6. Se toman 10 µl de volumen de suspensión celular y se realiza el conteo de células viables con azul de tripano en cámara de Neubauer.
7. Se centrifuga la suspensión de células a 3000g durante 3 minutos a 19°C para sedimentar las células. Aspiramos cuidadosamente el sobrenadante, teniendo cuidado de no alterar el sedimento celular en el tubo de cultivo.
8. De acuerdo con el conteo celular del tubo de cultivo, se agrega c.b.p. de DPBS para alcanzar una concentración de 120,000 células en 3 µl. Se pasa el volumen final a un tubo Eppendorf de 0.5 ml y lo llevamos al cuarto de cirugía para su trasplante.

### 8.3 Generación del modelo experimental de EP en ratas

Todos los estudios fueron conducidos de acuerdo con los principios y procedimientos autorizados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) en el Instituto de Fisiología Celular con el número de autorización MGC08-14; los animales fueron asignados de manera aleatoria a uno de 24 grupos (**Tabla 1**).

Un total de 148 ratas macho de la cepa Wistar, entre 230-250 g fueron usadas para este proyecto. Se tuvieron 2 grupos, el primero destinado a la lesión de la vía nigroestriatal a través de la inyección de 6-OHDA y el segundo como control para esta toxina, mediante la administración de solución salina al 0.9% (SS). Las ratas fueron resguardadas bajo las condiciones estándar: 12h/12h ciclo luz/obscuridad (luces encendidas a las 7:00 am), a una temperatura controlada de 22°C y con alimento *ad libitum*.

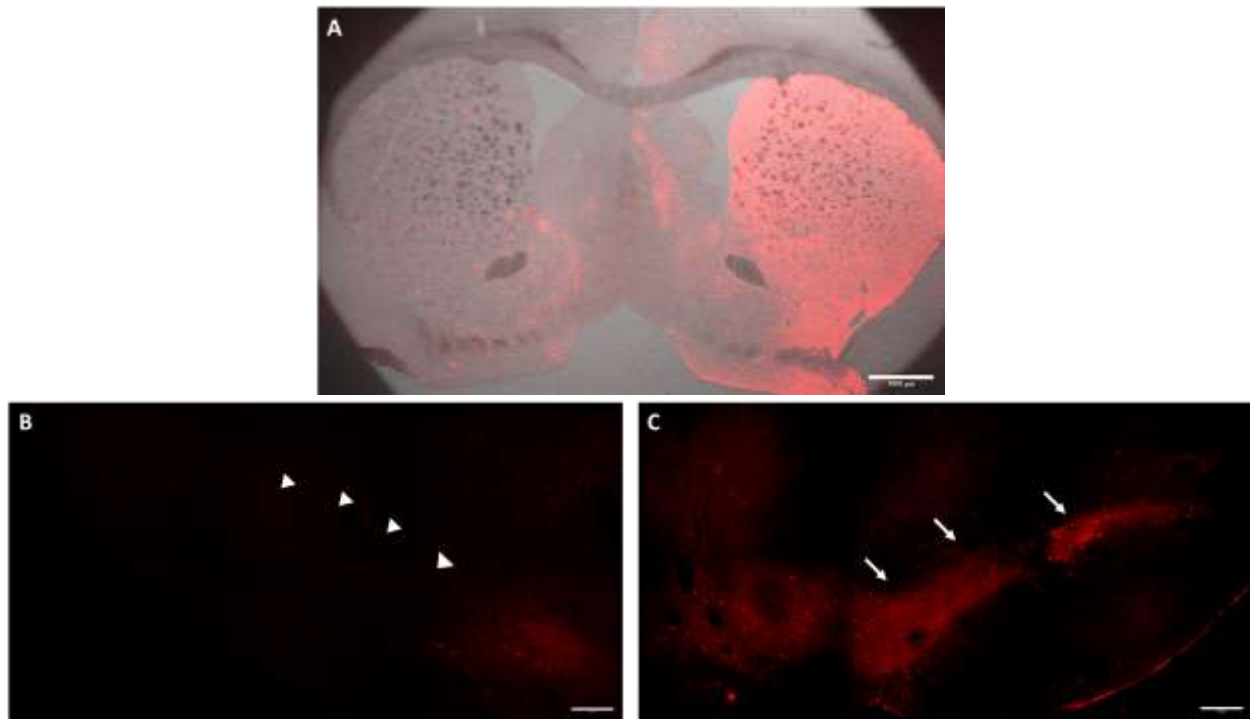
**Tabla 1. Distribución de los grupos.**

Tipo de Inyección	Duración del trasplante	Fase de diferenciación	Líneas celulares		
			Control	3X SNCA	SNCA KO
<b>6-OHDA</b>	15 días	Placa de Piso	9	7	8
		Células en el 5to día de maduración	9	4	7
	2 meses	Placa de Piso	8	8	8
		Células en el 5to día de maduración	8	5	8
<b>Solución salina al 0.9% (control)</b>	15 días	Placa de Piso	5	4	5
		Células en el 5to día de maduración	5	5	5
	2 meses	Placa de Piso	5	5	5
		Células en el 5to día de maduración	5	5	5
<b>Total:</b>					<b>148 ratas</b>

### 8.3.1 Lesión con 6-OHDA

Tres semanas antes del trasplante celular se procedió a inyectar 6-OHDA (**Figura 9**), un análogo hidroxilado de la dopamina que causa degeneración de la vía nigroestriatal [131], en la SNpc del hemisferio izquierdo de las ratas mediante un marco estereotáxico. Primero, las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con una combinación de ketamina y xilacina (87 mg/13 mg/kg, respectivamente) (Pisa Agropecuaria, México). Las coordenadas correspondientes al sitio de la lesión fueron determinadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (anteroposterior 4.8; lateral 1.6 y ventral 8.1) [132].

Cada infusión de 40  $\mu\text{g}$  6-OHDA fue estabilizada con 32  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de L-ascorbato, para impedir la oxidación de la neurotoxina, en un volumen total de 0.5  $\mu\text{l}$  de SS, a una velocidad de 0.125  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Al grupo control únicamente se le inyectó el mismo volumen de SS. La **figura 10** muestra un ejemplo de un corte coronal de encéfalo a nivel de núcleo estriado (**A**) y SNpc (**B**) donde el hemisferio izquierdo muestra denervación de la vía nigroestriatal, en comparación, el lado contralateral muestra señal de TH (**C**), lo que indica una correcta lesión mediante el uso de 6-OHDA.



**Figura 10. Degeneración de la vía nigroestriatal.** Imágenes representativas del (**A**) núcleo estriado donde se observa denervación de la vía nigroestriatal del hemisferio izquierdo ipsilateral al sitio de la lesión, valorada a través de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH, señal en color rojo). La imagen está sobrepuesta con otra de campo claro para delimitar los hemisferios cerebrales; magnificación 1.5X, barra de escala 1000  $\mu\text{m}$ . (**B**) El mismo efecto de denervación se puede observar en la sustancia nigra, sitio del nacimiento de las aferencias dopaminérgicas (triángulos blancos). En comparación, el núcleo estriado y la SNpc contralateral no lesionada (flechas blancas) muestran expresión de TH (**A**, lado derecho y **C**), lo que se traduce en integridad de dicha vía. **B** y **C**, Magnificación 10X, barra de escala 250  $\mu\text{m}$ .

### **8.3.2 Prueba de giro inducida con anfetamina**

Después de 15 días de haberse efectuado la lesión con 6-OHDA, las ratas fueron sometidas a una prueba de giro para determinar si la vía nigroestriatal había sido lesionada correctamente, esta prueba tiene su fundamento en la acumulación de dopamina estriatal estimulada por la administración de anfetamina, que conduce a un desbalance en la concentración de este neurotransmisor entre el lado lesionado y el no lesionado, manifestándose como movimientos estereotipados ipsilaterales al hemisferio lesionado [133, 134]. Para esto se inyectó anfetamina (4 mg/kg) intraperitoneal y se cuantificó el número de giros ipsilaterales a la lesión a través del software Matlab. Aquellas ratas con más de 400 giros en un lapso de 1.5 horas fueron incluidas en el grupo lesión, mientras que las que no lo superaran fueron descartadas. Esta misma prueba se usó a los 15 días post-trasplante (dpt) y 2 meses post-trasplante (mpt) en los grupos destinados a 2 meses de evaluación.

### **8.4 Trasplante celular**

Una semana posterior a la prueba de giro se realizaron los trasplantes celulares, mediante el mismo método y coordenadas usadas para inyectar la 6-OHDA. Un volumen de 0.5 µl de DPBS seguidos de 120,000 células en 3 µl de DPBS fueron introducidas en una jeringa Hamilton (Thomas Scientific, 8929C51). Se inyectaron durante un minuto, la jeringa se dejó 6 minutos más para que las células terminaran de descender y se retiró lentamente la aguja para evitar reabsorción.

### **8.5 Inmunosupresión**

Para evitar una reacción de rechazo inmunológico hacia el trasplante celular se administraron 100 mg/kg/día de ciclosporina (100 mg/ml) (Cyclosporin, Alphachem) vía oral y 0.1 ml diluido en los 750 ml de agua destinada al consumo diario de las ratas, desde el día anterior al trasplante y hasta un día previo a la perfusión.

### **8.6 Eutanasia y extracción del encéfalo**

Para inducir la eutanasia, a las ratas se les administró intraperitonealmente 1 ml de pentobarbital sódico al 6.3% (Pisabental). Posteriormente, se perfundieron intracardiamente con 200 ml de solución salina de fosfatos (PBS), seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4% a 4°C. Los encéfalos fueron extraídos y se empezó un proceso de post-fijación en paraformaldehído al 4% durante un día, seguido de cambios de sacarosa al 10%, 20% y 30% en los 3 días posteriores. Al terminar se hicieron cortes coronales de encéfalo con un grosor de 40 µm. Finalmente, los cortes se criopreservaron a -4°C usando una solución anticongelante (50% de PBS, 25% de glicerol y 25% de etilenglicol).



## 8.7 Inmunofluorescencia

### 8.7.1 Inmunofluorescencia *in vitro*

Las inmunofluorescencias de cultivo celular se realizaron de acuerdo con el kit de inmunocitoquímica de neuronas dopaminérgicas humanas (Invitrogen, A29515). El cultivo celular se fijó sobre la cámara de cultivo (Thermo Scientific, 154941) usando una solución de fijación (formaldehído al 4% en buffer de solución salina de fosfatos para inmuno (PBSi)). A continuación el cultivo fijado se trató con ImmunoRetriever 20X (diluido en PBS) (Bio SB, BSB0020) a 65°C durante 20 minutos, dejándolo atemperarse durante 15 minutos. Posteriormente el cultivo se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con solución de permeabilización (0.5% Tritón X-100 en PBSi) / Solución de bloqueo (3% de BSA en PBSi). Al terminar se colocó el anticuerpo primario (**Tabla 2**), diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, seguido del anticuerpo secundario (**Tabla 3**), diluido en PBSi durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar se añadió DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, 1:10,000; Biostatus Limited) y se incubó durante 5 minutos. Por último, se usó *ProLong Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen, P36970) para un almacenamiento prolongado.

### 8.7.2 Inmunofluorescencia *ex vivo*

Los cortes de cerebro se lavaron 3 veces en PBSi durante 10 minutos, luego se enjuagaron otras 3 veces durante 10 minutos en PBSi al 0.3% Tritón X-100, tratado con ImmunoRetriever 20X (PBSi diluido) (Bio SB, BSB 0020) a 65°C durante 35 minutos. De igual forma, se lavó tres veces con PBSi y se incubó con los anticuerpos primarios (**Tabla 2**) diluidos en solución de bloqueo (PBSi al 10% de albúmina de suero bovino) durante la noche a 4°C. Después de lavar en PBSi 3 veces, los cortes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 3**). Finalmente, los cortes se lavaron con PBSi 3 veces y se añadió DAPI. Cada corte de cerebro se montó en portaobjetos *Superfrost* (Thermo Fisher Scientific) con *ProLong Diamond Antifade Mountant*.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios**

Anticuerpo Primario	Marca	Huésped	# Catalogo	Dilución
<b>βIII-Tubulina</b>	Biologend	Ratón	801202	1:500
<b>Doblecortina</b>	Santa Cruz Biotechnology	Cabra	SC8066	1:250
<b>Lmx1a</b>	Merck	Conejo	HPA030088	1:500
<b>SC121</b>	Takara	Ratón	Y40410	1:500
<b>Tirosina hidroxilasa</b>	Merck millipore	Conejo	AB152	1:500
<b>Tirosina hidroxilasa</b>	Merck millipore	Ratón	MAB318	1:500
<b>α-sinucleína</b>	BD biosciences	Ratón	610787	1:500
<b>α-sinucleína</b>	Abcam	Conejo	ab138501	1:150

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios**

Anticuerpo Secundario	Marca	Huésped	# Catalogo	Dilución
-----------------------	-------	---------	------------	----------

<b>Anti-ratón IgG, Alexa fluor 488</b>	Jackson ImmunoResearch Inc.	Burro	711-545-152	1:1000
<b>Anti-cabra IgG, Alexa fluor 568</b>	Invitrogen	Burro	A-11057	1:400
<b>Anti-conejo IgG, Alexa Fluor 594</b>	Jackson ImmunoResearch Inc.	Burro	711-585-152	1:1000

## 8.8 Microscopía

las imágenes de los cultivos y tejidos las adquirimos mediante el microscopio confocal Zeiss LSM800 invertido, el microscopio confocal Olympus FV1000 multi-fotónico (Upright BX61WI e IX81 invertido) y el microscopio de epifluorescencia Leica DM6000B. Se utilizó el programa ImageJ/FIJ para el procesamiento de las imágenes. Para realizar el conteo celular de los diferentes marcadores se empleó la extensión Cookbook (<https://imagej.net/Cookbook>). Se usaron como mínimo tres campos de dos cultivos independientes y dos cortes histológicos como mínimo por cada marcador y línea celular.

### 8.8.1 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson

El coeficiente de correlación de Pearson consiste en la correlación lineal estadística entre dos variables [135], su uso ha sido validado para la colocación entre fluoróforos en microscopía [136-138]. Se empleó la extensión EzColocalization para el programa ImageJ (<http://sites.imagej.net/EzColocalization/plugins/>) siguiendo la metodología reportada por Stauffer *et al.* [139]. Se usaron como mínimo tres campos de dos cultivos independientes y dos cortes histológicos como mínimo por cada marcador y línea celular.

## 8.9 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) e intervalo de confianza (IC, par de números entre los cuales se estima que estará un valor desconocido a un nivel de confianza dado) al 95%. Las pruebas estadísticas y las réplicas biológicas se indican en los pies de figura. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism v8.0 para Windows. Se estableció un nivel alfa de  $p < 0.05$  como umbral de significación.

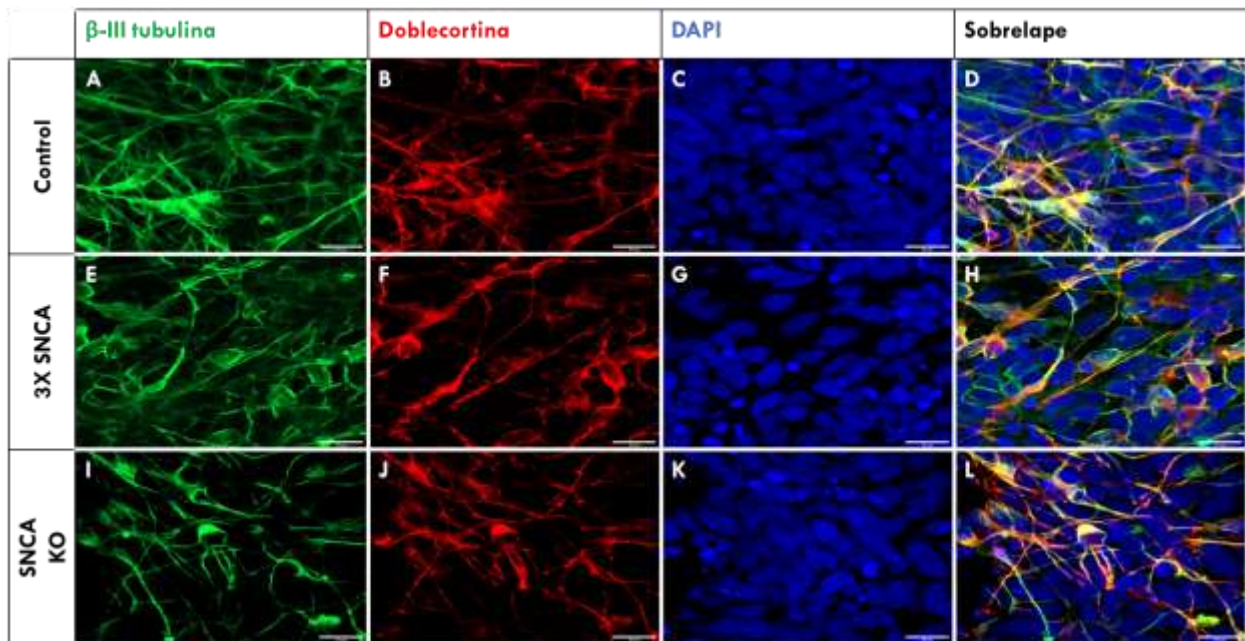
## 9. Resultados

Con el fin de valorar la capacidad de diferenciación de la línea celular 3X SNCA y compararla con dos líneas control (Control, 2 alelos del gen SNCA y SNCA KO, *knockout* para el gen SNCA), analizamos tres estadios de diferenciación dopaminérgica *in vitro*, que son las células de PP y células del quinto y decimoquinto día de la fase de maduración. Para una síntesis de los resultados ver **Tablas anexas 1, 2 y 3**.

### 9.1 Diferenciación dopaminérgica *in vitro*

#### 9.1.1 Las células con 3X SNCA son capaces de desarrollar un fenotipo neuronal *in vitro*

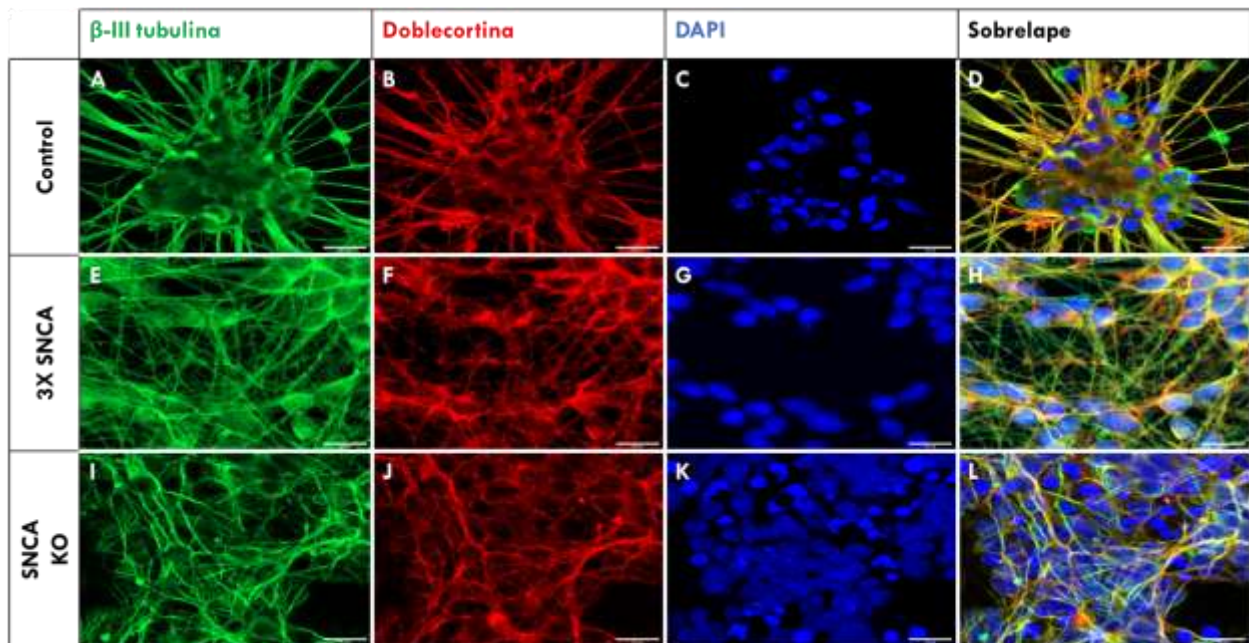
En la etapa de células de PP, las tres líneas celulares mostraron expresión tanto de  $\beta$ -III tubulina, marcador de microtúbulos de neuronas inmaduras y maduras [140, 141] (**Figura 11 A, E, I**), así como de doblecortina, una fosfoproteína asociada a microtúbulos presente en neuroblastos y neuronas inmaduras [141, 142] (**Figura 11 B, F, J**). Es de destacar que la expresión de ambos marcadores es similar en todas las líneas celulares. Además, las células se encuentran en monocapa, arquitectura característica de PP [106].



**Figura 11. Expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina en células de la placa de piso derivadas de células troncales pluripotentes inducidas humanas.** Imágenes representativas de la línea celular Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**J-M**). Las tres líneas celulares muestran una expresión similar de  $\beta$ -III tubulina (**A, E, I**) y doblecortina (**B, F, J**), así como una distribución en monocapa. DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

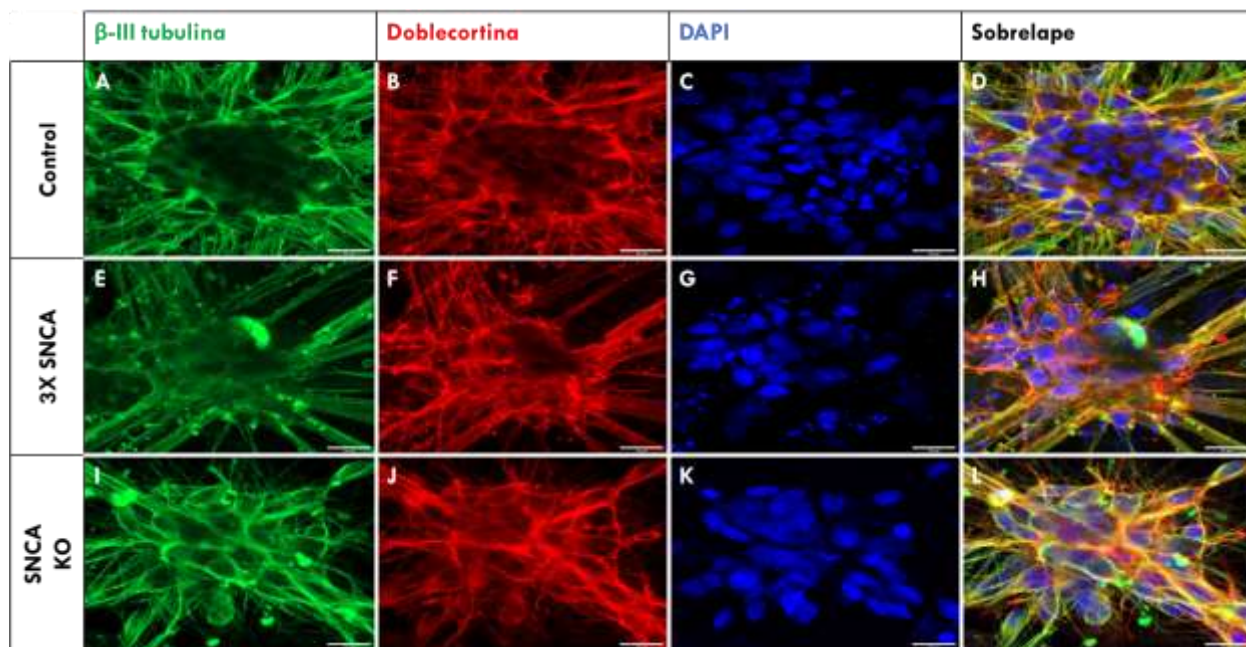
Una vez que las células de PP han logrado una confluencia mayor al 90% en el cuarto pasaje, se recolectan para iniciar la fase de maduración, donde realizamos los análisis en el quinto y decimoquinto día; este último correspondiente a la etapa final de diferenciación en cultivo.

Al quinto día de la fase de maduración se puede observar que las células de las 3 líneas presentan un fenotipo neuronal inmaduro (**Figura 12**), a la vez que las líneas celulares 3X SNCA y SNCA KO muestran una distribución en monocapa similar a la que se observa con las células de PP (**Figura 12 H y I vs. Figura 12 H y L**), mientras que la línea celular Control ya exhibe una distribución en cúmulos (**Figura 12 D**). En esta etapa, la expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina vista de forma cualitativa es similar en las tres líneas celulares (**Figura 12**). Además, ambos marcadores se encuentran colocalizando en general en las mismas células.



**Figura 12. Expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**I-L**). Las tres líneas celulares muestran una expresión similar de  $\beta$ -III tubulina (**A, E, I**) y doblecortina (**B, F, J**), no obstante, las células de la línea celular Control se empiezan a agrupar en estructuras similares a cúmulos (**D**), evento que no ocurre en las líneas celulares 3X SNCA (**H**) y SNCA KO (**L**) donde continúan en monocapa. DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

Finalmente, en el decimoquinto día de la fase de maduración, observamos nuevamente la expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina en las tres líneas celulares y colocalizando en las mismas células (**Figura 13**), similar a lo que se observa en el quinto día de la fase de maduración, con la diferencia de que la distribución de las tres líneas celulares ya es en estructuras en forma de cúmulos (**Figura 13 D, H, L**).



**Figura 13. Expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina en el decimoquinto día de la fase maduración dopaminérgica.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (J-K). Las tres líneas celulares muestran una expresión similar de  $\beta$ -III tubulina (A, E, I) y doblecortina (B, F, J), incluso ya muestran una distribución similar a cúmulos (D, H, L). DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

Estos resultados indican que las tres líneas celulares son capaces de adquirir un fenotipo neuronal, ya que tienen expresión de  $\beta$ -III tubulina, pero éste fenotipo todavía es de neurona inmadura, porque la expresión de doblecortina está presente durante todo el protocolo de diferenciación dopaminérgica. Sin embargo, sí se observa un retraso en la diferenciación al quinto día en las líneas 3XSNCA y SNCA KO. Lo anterior debido a que mientras que en la línea control se observa la formación de estructuras parecidas a cúmulos, éstas se encuentran ausentes en las otras dos líneas (**Figura 13 D vs. H y L**).

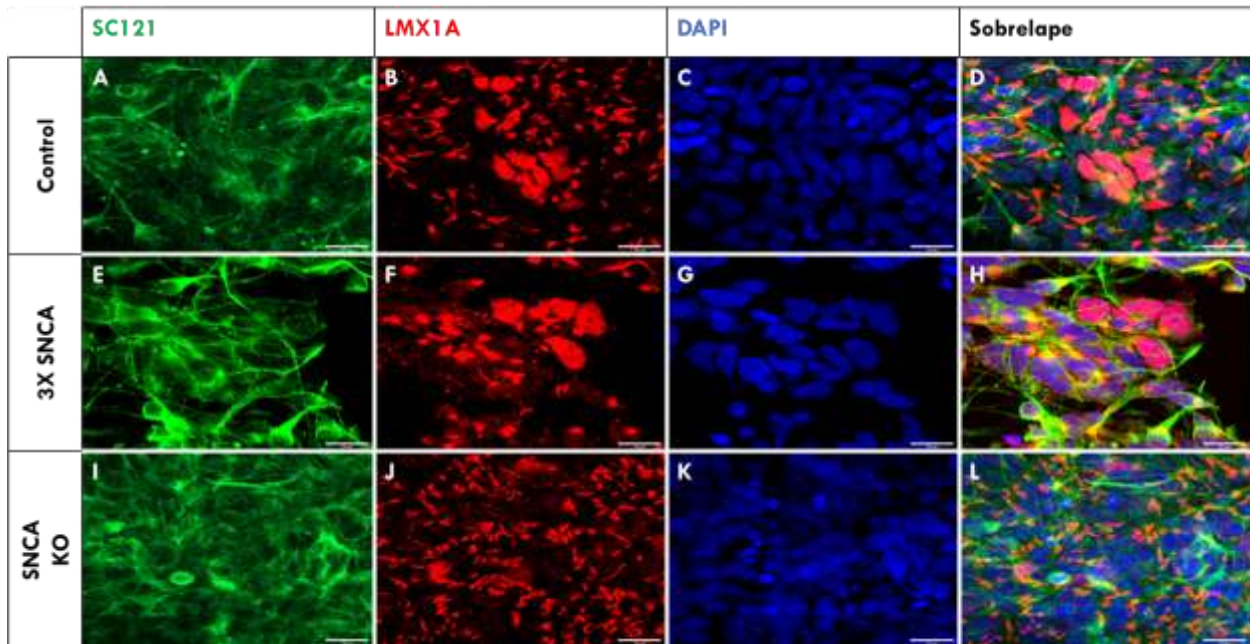
Por lo tanto, bajo nuestro protocolo de cultivo, la triplicación del locus del gen SNCA y la ausencia de éste (mediada por el *knockout* isogénico del gen SNCA), no impiden la adquisición de un fenotipo neuronal.

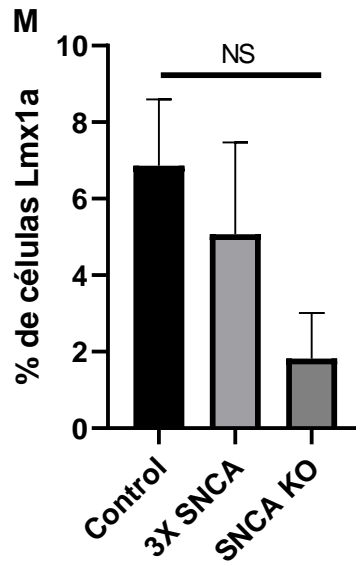
### 9.1.2 La línea celular 3X SNCA es capaz de desarrollar un fenotipo dopaminérgico *in vitro*

Una vez que determinamos que las tres líneas celulares son capaces de desarrollar un fenotipo neuronal, el siguiente paso fue identificar si desarrollaban un fenotipo dopaminérgico mesencefálico. Para este fin, usamos el anticuerpo de citoplasma humano SC121 para delimitar el soma y prolongaciones celulares de las células de PP, a su vez que empleamos los marcadores Lmx1a y TH para la identificación del fenotipo dopaminérgico mesencefálico [64].

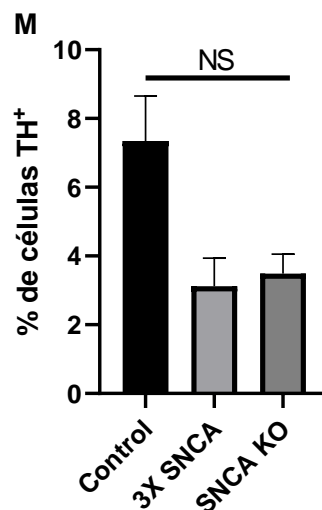
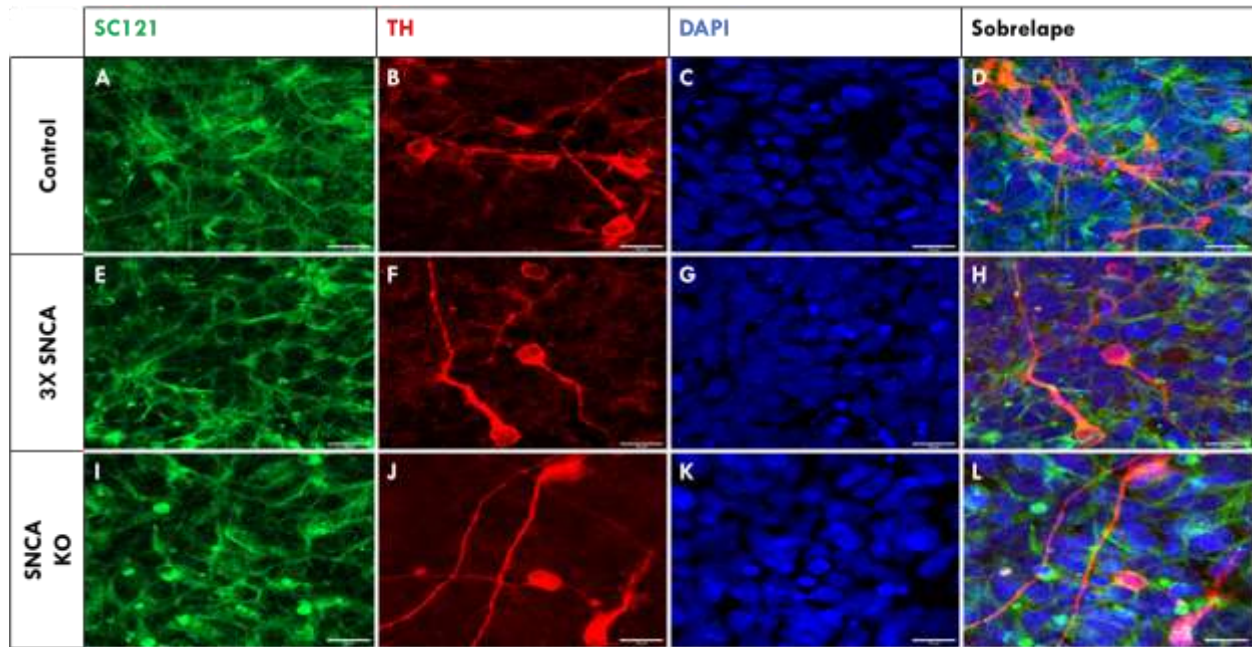
De acuerdo con lo esperado, observamos en etapa de PP que las células eran positivas a marcador SC121 (SC121<sup>+</sup>) (**Figura 14 A, E, I y Figura 15 A, E, I**). Las células de PP son en su mayoría neuroblastos o neuronas inmaduras (**Figura 14**); sin embargo, ya un pequeño porcentaje de células empiezan a mostrar un fenotipo dopaminérgico caracterizado por células Lmx1a positivas (Lmx1a<sup>+</sup>) (Control  $6.86 \pm 1.73$ ; 3X SNCA  $5.074 \pm 2.39$ ; SNCA KO  $1.82 \pm 1.18$ ) (**Figura 14 B, F, J, M**) y células TH<sup>+</sup> (Control  $7.35\% \pm 1.3$ ; 3X SNCA  $3.12\% \pm 0.81$ ; SNCA KO  $3.49\% \pm 0.56$ ) (**Figura 15 B, F, J, M**). No se encontró diferencia significativa entre los grupos evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis (Lmx1a, ANOVA  $p=0.03028$ ; Kruskal-Wallis  $p= 0.9662$  para Control vs. 3X SNCA,  $p=0.3927$  para Control vs. SNCA KO y  $p>0.9999$  para 3X SNCA vs. SNCA KO; TH, ANOVA  $p=0.0531$ ; Kruskal-Wallis  $p= 0.0770$  para Control vs. 3X SNCA,  $p=0.1434$  Control vs. SNCA KO y  $p>0.9999$  para 3X SNCA vs. SNCA KO) (**Figura 14 M**). A pesar de esto, si se puede apreciar una tendencia en el sentido de que tanto en la línea 3X SNCA como la SNCA KO tienen un número menor de células Lmx1a<sup>+</sup> y TH<sup>+</sup> en comparación al Control.

En conjunto, estos resultados nos indican que en etapa de PP se está iniciando la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico mesencefálico, independientemente de si son portadoras de la 3X SNCA o si son *knockout* isogénico para dicho gen.





**Figura 14. Expresión de Lmx1a en células de placa de piso derivadas de células troncales pluripotentes inducidas humanas.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (I-L). Del total de células SC121<sup>+</sup>, un pequeño porcentaje expresa el marcador de diferenciación dopaminérgica Lmx1a (B, F, J); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m. (M) Porcentaje de células positivas a Lmx1a (Lmx1a<sup>+</sup>) que fue calculado relativo al número de núcleos marcados con DAPI en las células SC121<sup>+</sup>. La barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), la cual fue obtenida de dos cultivos independientes. Se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis. No significativo (NS).

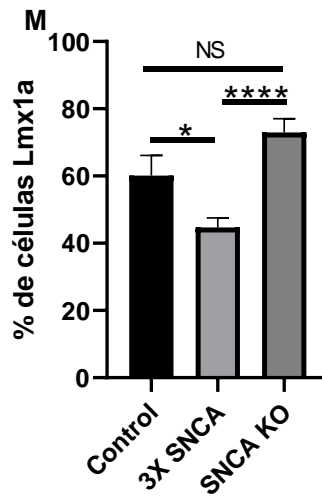
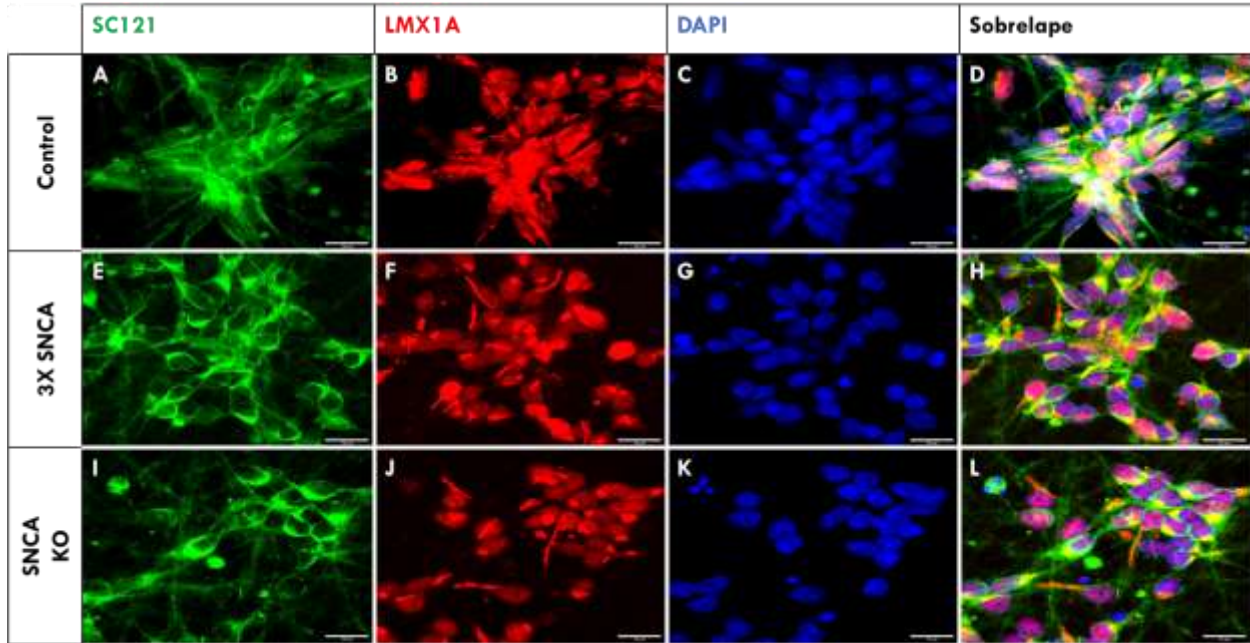


**Figura 15. Expresión de TH en células de placa de piso derivadas de células troncales pluripotentes inducidas.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**I-L**). Del total, un pequeño porcentaje de células expresa el marcador de neuronas dopaminérgicas tirosina hidroxilasa (TH) (**B, F, J**); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m. (**M**) Porcentaje de células positivas a TH (TH<sup>+</sup>) que fue calculado relativo al número de núcleos marcados con DAPI, la barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), la cual fue obtenida de dos cultivos independientes. Se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis. No significativo (NS).

Posteriormente, en el quinto día de la fase de maduración se observa la presencia de células SC121<sup>+</sup> (**Figura 16 A, E, I**) y un mayor número de células Lmx1 $\alpha$ <sup>+</sup> (Control 60.11  $\pm$ 6.02; 3X SNCA 44.73  $\pm$ 2.84; SNCA KO 72.98  $\pm$ 4.10) (**Figura 16 B, F, J, M**), el cual es mayor al cuantificado en las células de PP (**Tabla anexa 1**). La diferencia observada en esta etapa, entre la línea celular Control y la línea celular 3X SNCA es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Al igual que la



observada entre la línea celular 3X SNCA y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 16 M**).



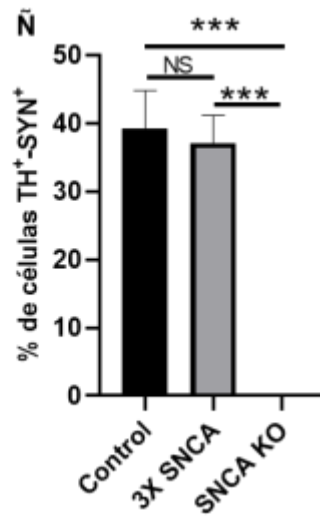
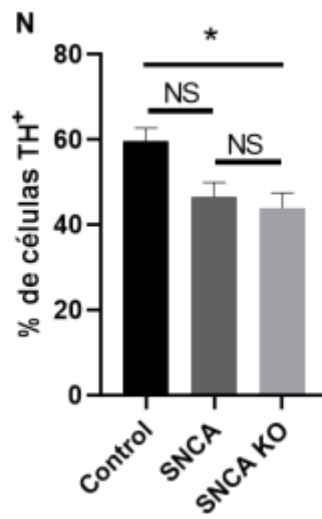
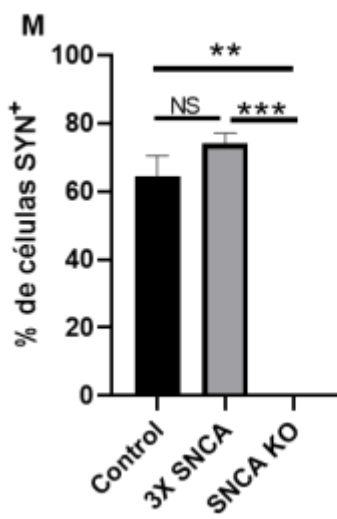
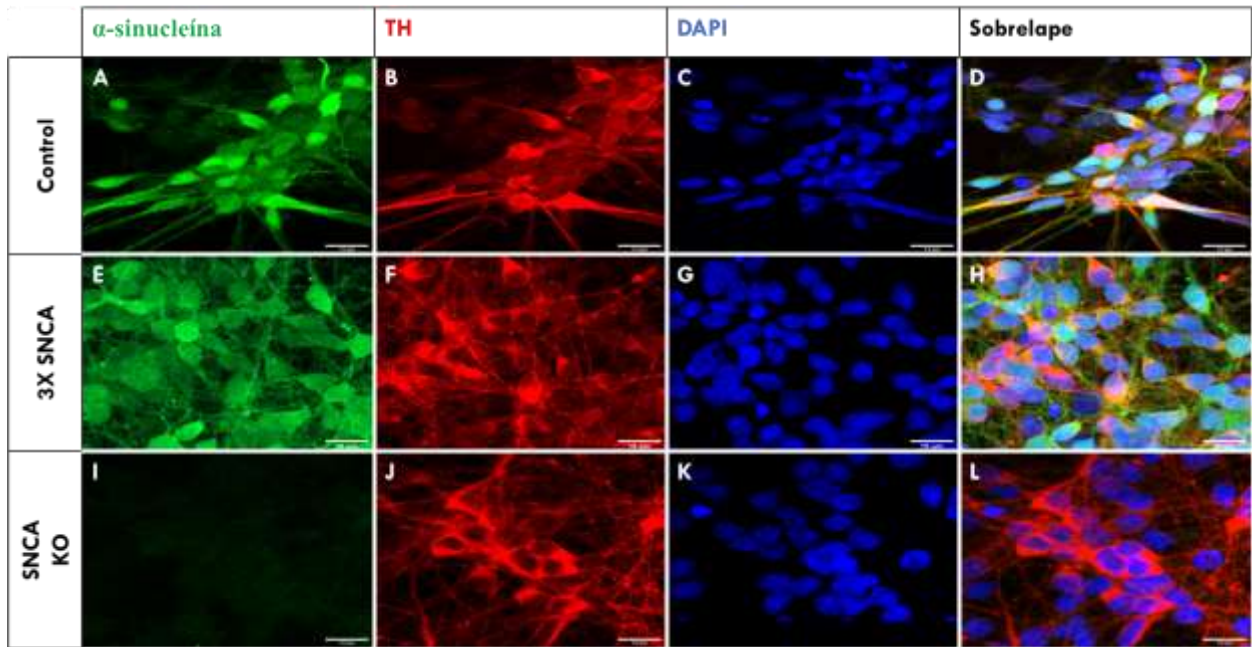
**Figura 16. Expresión de Lmx1a en células del quinto día de la fase de maduración dopaminérgica.**

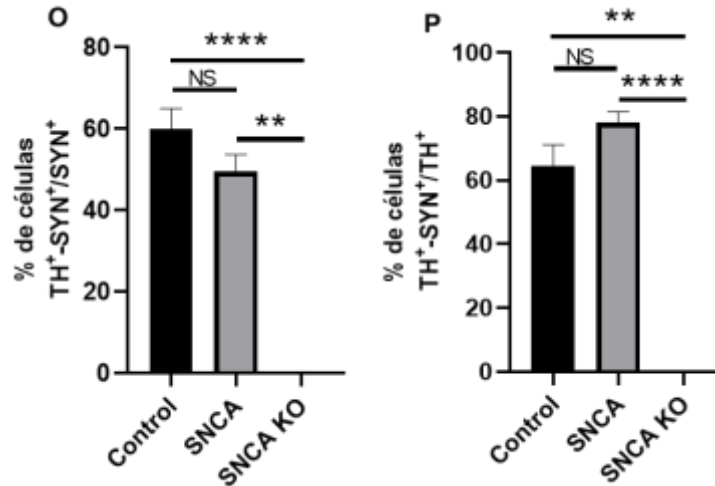
Imágenes representativas de las líneas celulares Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**I-L**). En comparación a las células de la PP (**Figura 14** y **Tabla anexa 1**), un mayor número de células expresan el marcador de diferenciación dopaminérgica Lmx1a, con una localización nuclear (**B, F, J**); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu\text{m}$ . (**M**) Porcentaje de células positivas a Lmx1a que fue calculado relativo al número de núcleos marcados con DAPI; la barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm\text{EEM}$ ), la cual fue obtenida de dos cultivos independientes. Se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis. No significativo (NS), \* $p < 0.05$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Adicionalmente, para determinar si la  $\alpha$ -sinucleína, proteína implicada en la patología de la EP [21, 32], podría influir en la adquisición del fenotipo dopaminérgico, evaluamos su presencia a través de la cuantificación de células TH<sup>+</sup> y  $\alpha$ -sinucleína positivas ( $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>) en el quinto y decimoquinto día de la fase de maduración del protocolo de diferenciación usado.

En el quinto día observamos que tanto la línea celular Control (64.26%  $\pm$  6.20) como la línea 3X SNCA (74.04%  $\pm$  2.97) muestran un alto número de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup> (**Figura 16 A y E**, respectivamente). Mientras que la línea celular SNCA KO como se esperaba, no expresó  $\alpha$ -sinucleína (0%) (**Figura 16 I**). Por lo tanto, se observó una diferencia significativa entre la línea celular Control y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.005$ ), y entre la línea celular 3X SNCA y la línea celular SNCA KO ( $p = 0.0001$ ) (**Figura 16 M**). Con respecto al marcador TH, en las tres líneas celulares se observa su expresión citoplasmática (**Figura 17 B, F y J**) (Control 59.63%  $\pm$  3.11, IC 52.45-66.8; 3X SNCA 46.66%  $\pm$  3.39, IC 38.83-54.49 y SNCA KO 44.07%  $\pm$  3.49, IC 36.02-52.12), con diferencia significativa únicamente entre la línea celular Control y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.05$ ) (**Figura 17 N**).

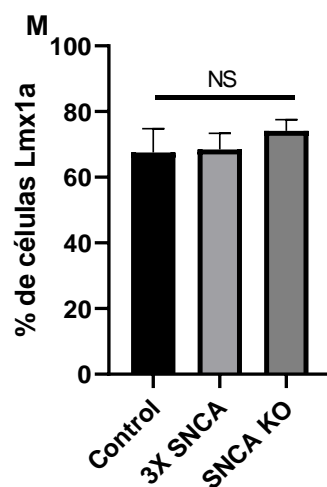
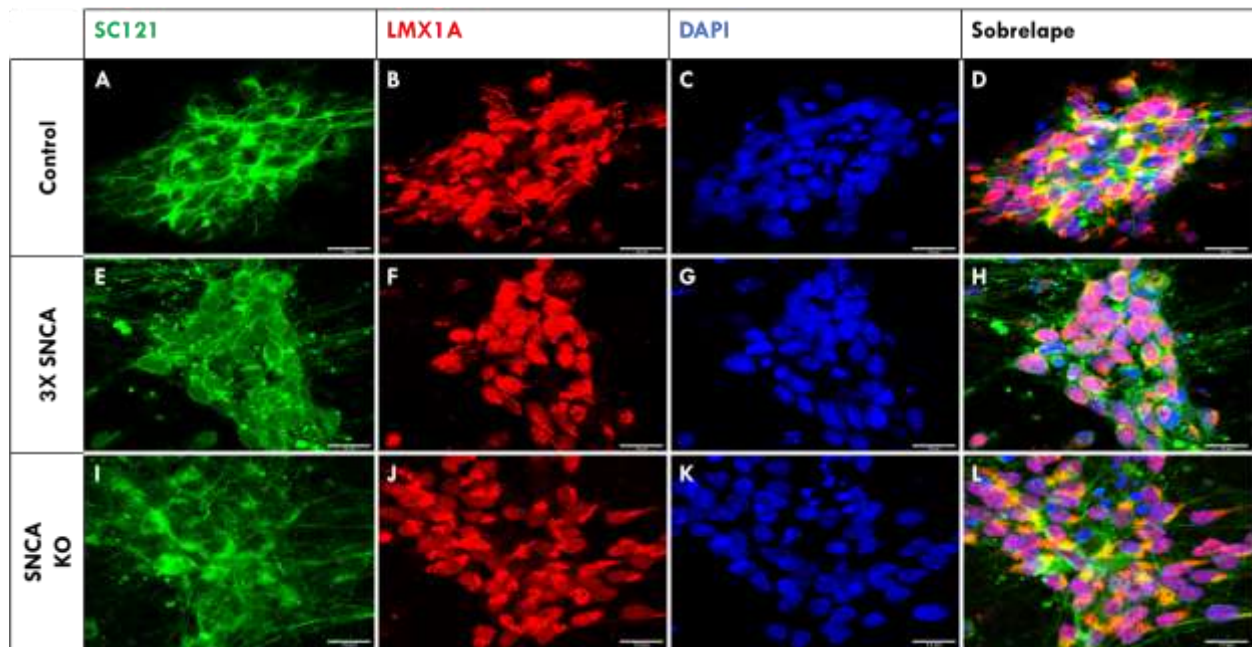
Así mismo, no encontramos diferencia significativa al momento de comparar el número de células con doble marcaje positivo para  $\alpha$ -sinucleína y TH ( $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>-TH<sup>+</sup>), entre la línea celular Control (39.20%  $\pm$  5.64) y la línea celular 3X SNCA (37.12%  $\pm$  4.08 (**Figura 17 Ñ**)). Observamos resultados similares al comparar el porcentaje de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>-TH<sup>+</sup> del total de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup> (Control 60.09%  $\pm$  4.92; 3X SNCA 49.55%  $\pm$  4.16 (**Figura 17 O**)). Así como al comparar el porcentaje de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>-TH<sup>+</sup> del total de células TH<sup>+</sup> (Control 64.67%  $\pm$  6.454, 3X SNCA 78.16%  $\pm$  3.361). Por lo que la 3X SNCA no parece tener efectos negativos sobre la expresión de TH y, por lo tanto, en la adquisición de un fenotipo dopaminérgico en esta etapa.





**Figura 17. Expresión de  $\alpha$ -sinucleína y tirosina hidroxilasa de células en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica.** Imágenes representativas de la línea celular Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (I-L). Como era de esperarse, la línea celular SNCA KO no muestra expresión de  $\alpha$ -sinucleína (A y E vs. I). Sin embargo, las tres líneas celulares muestran expresión de tirosina hidroxilasa (TH) (B, F v J), la cual en el sobrelape de imágenes colocaliza con aproximadamente el 35% de células con la  $\alpha$ -sinucleína (D y H); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m. (M) Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a  $\alpha$ -sinucleína (SYN<sup>+</sup>) en las tres líneas celulares. (N) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH positivas (TH<sup>+</sup>) en las tres líneas celulares. (Ñ) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup>. (O) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup> de las células SYN<sup>+</sup>. (P) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup> ende las células TH<sup>+</sup>. Los porcentajes de (M, N y Ñ) fueron calculados relativos al número de núcleos marcados con DAPI. La barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), la cual fue obtenida de dos cultivos independientes, se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p = 0.0001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Por otra parte, el análisis de resultados en el decimoquinto día de la fase de maduración (Figura 18), indica que el número de células Lmx1a<sup>+</sup> aumentó en las tres líneas celulares en comparación a los dos tiempos previos (Tabla anexa 1), Control (67.56%  $\pm$  7.21), 3X SNCA (68.47%  $\pm$  4.894) y SNCA KO (74.10%  $\pm$  3.451) (Figura 18 A-L), sin que se encontrara diferencia significativa entre los grupos ( $p = 0.677$ ) (Figura 18 M).



**Figura 18. Expresión de Lmx1a de células en el decimoquinto día de la fase maduración dopaminérgica.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (I-L). Un mayor número de células expresan el marcador de diferenciación dopaminérgica Lmx1a (B, F, J) en comparación a las células en la fase de PP y en el quinto día de la fase de maduración; DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m. (M) Porcentaje de células positivas a Lmx1a, que fue calculado relativo al número de núcleos marcados con DAPI; la barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm$ EEM), la cual fue obtenida de dos cultivos independientes. Se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis. No significativo (NS).

Asimismo, observamos diferencia significativa en la expresión de  $\alpha$ -sinucleína entre la línea celular Control (37.12%  $\pm$ 2.78) y la línea celular 3X SNCA (68.93%  $\pm$ 2.76). Es importante resaltar que en esta última etapa de diferenciación observamos este cambio debido a la disminución en el

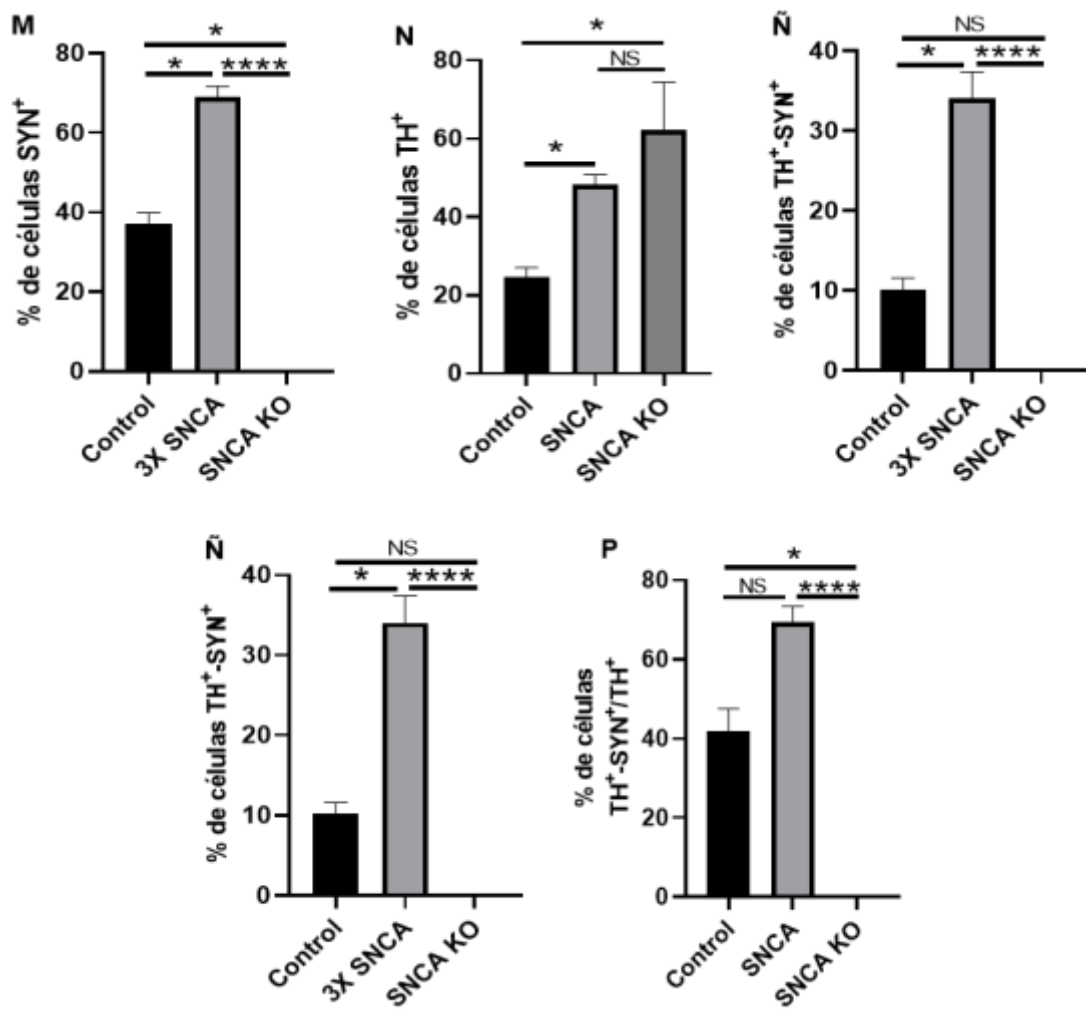
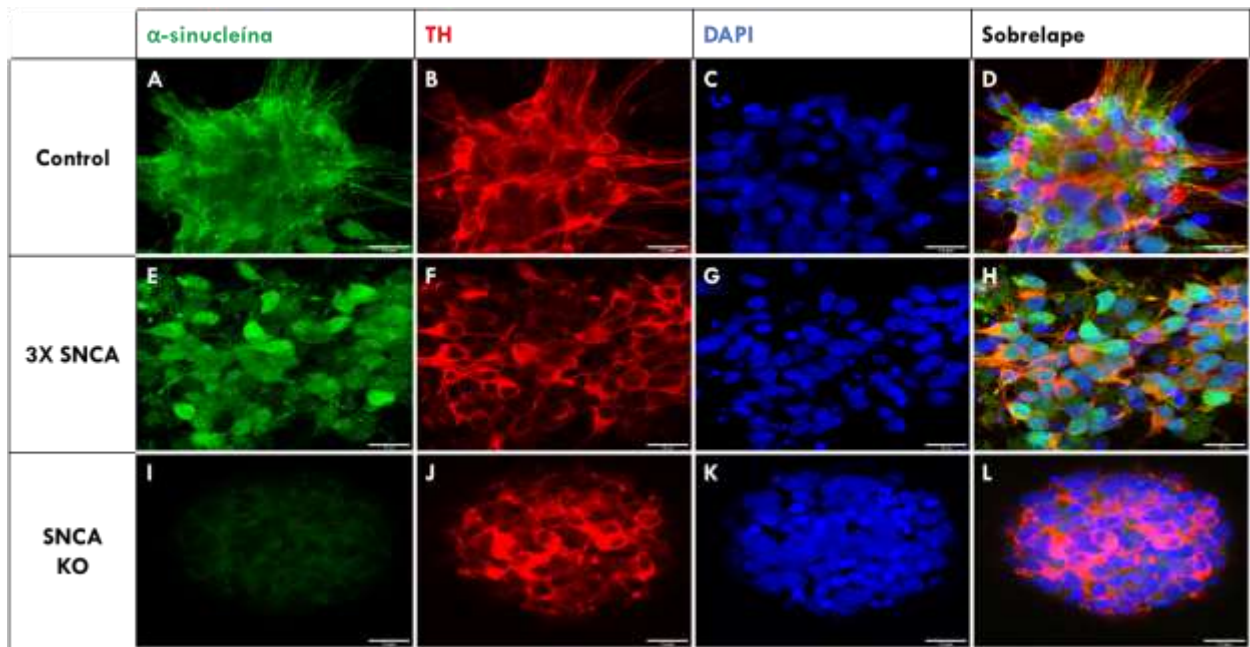
número de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup> en la línea Control en comparación al número observado en el quinto día de diferenciación (64.26% vs. 37.12%). Mientras que en la línea 3X SNCA, la cantidad de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup> permaneció casi constante en las dos últimas etapas de diferenciación dopaminérgica (74.04% en el quinto día y 68.93% en el decimoquinto día) (**Figura 19 M y Tabla anexa 2**). Por otro lado y conforme a lo esperado, la línea celular SNCA KO, permaneció sin expresión de  $\alpha$ -sinucleína (0%) (**Figura 19 A, E vs. I**).

En relación a la expresión de TH, en esta etapa si observamos diferencias significativas en las tres líneas celulares (Control 24.76%  $\pm$ 2.28, 3X SNCA 48.14%  $\pm$ 2.59, SNCA KO 62.18%  $\pm$ 12.24) (**Figura 19 B, F, J**); la diferencia entre la línea celular Control y la 3X SNCA así como entre la línea celular Control y la línea celular SNCA KO fue significativa ( $p < 0.05$ , para ambos casos) (**Figura 19 N**). Adicionalmente, observamos que la expresión de TH colocalizó en la mayoría de las células con la de  $\alpha$ -sinucleína, tanto en la línea celular Control como en la línea celular 3X SNCA (**Figura 19 D, H**). Nuevamente, al comparar el número de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup> del total de núcleos en células SC121<sup>+</sup>, la línea celular 3X SNCA fue la que mostró el mayor porcentaje (Control 10.15%  $\pm$ 1.42, 3X SNCA 34.04%  $\pm$ 3.35, 26.30-41.78; SNCA KO 0%), el cual fue significativamente diferente al compararlo con la línea celular Control ( $p < 0.05$ ) y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 19 Ñ**).

De igual manera, la línea celular 3X SNCA tuvo el mayor porcentaje de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>-TH<sup>+</sup> del total de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup> (Control 27.75%  $\pm$ 4.02, 3X SNCA 49.00%  $\pm$ 4.10, SNCA KO 0%), con diferencia significativa entre la línea celular Control y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.05$ ). Así como entre la línea celular 3X SNCA y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 19 O**). Además, la línea celular 3X SNCA exhibió el mayor porcentaje de células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>-TH<sup>+</sup> del total de células TH<sup>+</sup> (Control 41.95%  $\pm$ 5.60; 3X SNCA 69.35%  $\pm$ 4.04, SNCA KO 0%). En este caso, hubo diferencia significativa entre la línea celular Control y la línea celular SNCA KO ( $p < 0.05$ ) y entre la línea 3X SNCA y la línea SNCA KO ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 19 P**).

Si bien no hay diferencia estadística entre las líneas celulares Control y 3X SNCA, si se aprecia una tendencia hacia una mayor expresión de TH en las células  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup>, así como una mayor expresión de  $\alpha$ -sinucleína en las células TH<sup>+</sup> en la línea 3X SNCA (**Tabla anexa 1**).

Estos resultados muestran que la triplicación del gen SNCA da como resultado un incremento en la expresión de  $\alpha$ -sinucleína, la cual aumenta conforme avanza el protocolo de diferenciación dopaminérgica, alcanzando el porcentaje más alto desde el quinto día del protocolo de diferenciación dopaminérgica (**Tabla anexa 1**). Sin embargo, esta mayor expresión no parece afectar la expresión de los marcadores de la adquisición del fenotipo dopaminérgico mesencefálico aquí analizados.



**Figura 19. Expresión de  $\alpha$ -sinucleína y tirosina hidroxilasa en el decimoquinto día de la fase de maduración dopaminérgica.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**I-L**). Al igual que en el quinto día de la fase de maduración, la línea celular SNCA KO no muestra expresión de  $\alpha$ -sinucleína (SYN<sup>+</sup>) (**A** y **E** vs. **I**). Sin embargo, las tres líneas celulares muestran expresión de TH<sup>+</sup> (**B**, **F** v **J**), además, ciertas células SYN<sup>+</sup> también son TH<sup>+</sup> (**D** y **H**); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m. (**M**) Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas de las tres líneas celulares a  $\alpha$ -sinucleína (SYN<sup>+</sup>). (**N**) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup> de las tres líneas celulares. (**Ñ**) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup> (**O**). Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup> entre las células SYN<sup>+</sup>. (**P**) Gráfica que muestra el porcentaje de células TH<sup>+</sup>-SYN<sup>+</sup> entre las células TH<sup>+</sup>. Los porcentajes de (**M**, **N** y **Ñ**) fueron calculados relativos al número de núcleos marcados con DAPI, la barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm$  EEM), la cual fue obtenida de dos cultivos independientes, se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p = 0.0001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## 9.2 Diferenciación dopaminérgica *in vivo*

### 9.2.1 Las células de la PP de la línea celular 3X SNCA son capaces de sobrevivir en la SNpc de rata

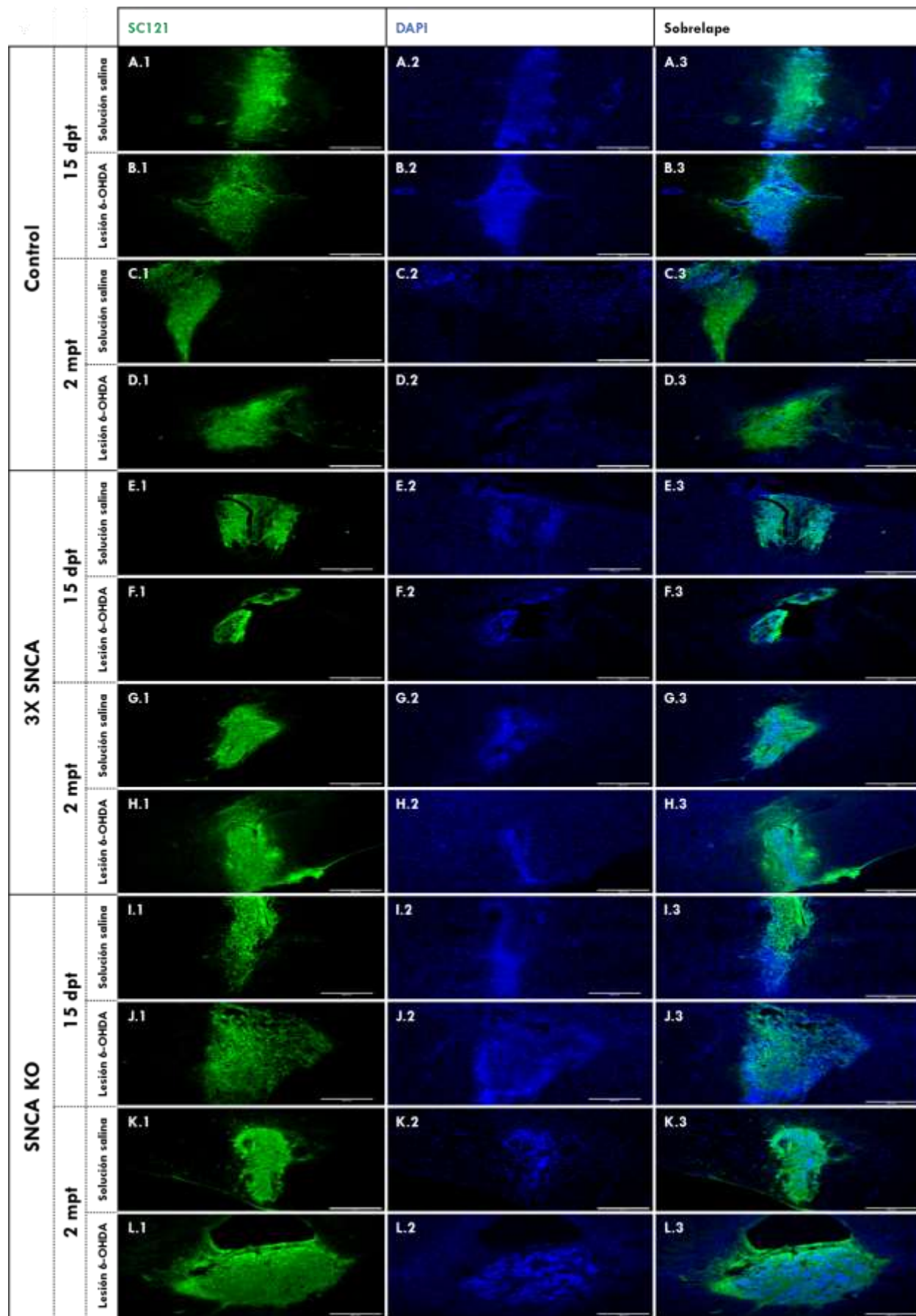
Una vez determinado que las tres líneas celulares pueden diferenciarse hacia un fenotipo dopaminérgico mesencefálico *in vitro*, el siguiente paso fue evaluar si eran capaces de sobrevivir e incluso desarrollar un fenotipo dopaminérgico *in vivo* en la SNpc de ratas lesionadas con 6-OHDA (como modelo experimental de la EP) o en el control de lesión con SS.

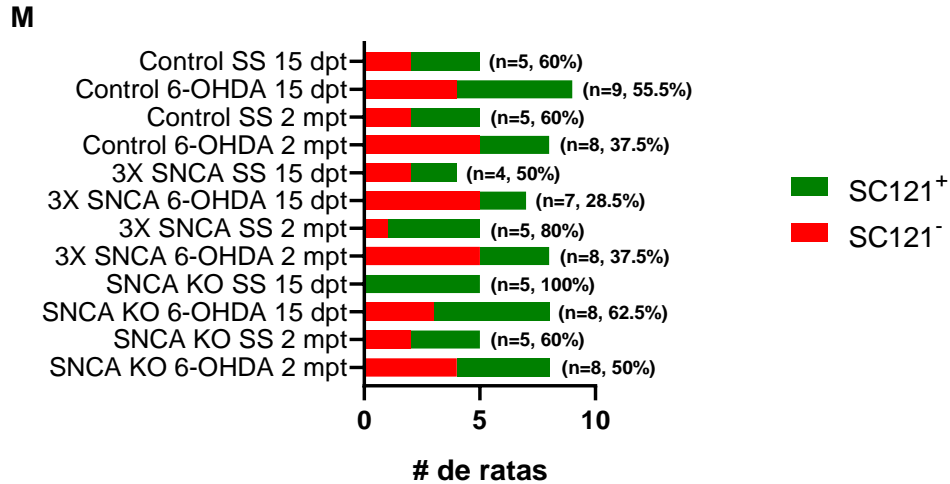
Para este fin trasplantamos cada una de las tres líneas celulares en dos etapas diferentes, PP y en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica. Realizamos las pruebas para detectar sobrevivencia (mediante el anticuerpo SC121), presencia del fenotipo neuronal (usando los anticuerpos  $\beta$ -III tubulina y doblecortina) y desarrollo del linaje dopaminérgico (a través del anticuerpo TH) a los 15 dpt y 2 mpt.

En etapa de PP, tanto a 15 dpt como a 2 mpt, hubo encéfalos positivos para el anticuerpo SC121 (SC121<sup>+</sup>), ya fuera en ratas con lesión de 6-OHDA o control de lesión con SS (**Figura 20 A-L** y **Tabla anexa 2**), lo que indica que las células trasplantadas lograron sobrevivir. El porcentaje de ratas con tejido SC121<sup>+</sup> fue como mínimo 28.5% (correspondiente al grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA a 15 dpt con la línea celular 3X SNCA) y como máximo 100% (ratas con control de lesión a 15 dpt con la línea celular SNCA KO) (**Figura 20-M**).

Estos resultados nos indican que, tanto la triplicación del gen SNCA como su ausencia, no tienen implicaciones evidentes sobre la sobrevivencia del trasplante celular en etapa de PP, asimismo, muestran que la SNpc de rata es permisiva a dicha sobrevivencia.







**Figura 20. Supervivencia a 15 días y 2 meses post-trasplante de las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de placa de piso.** Imágenes representativas de la línea celular Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (I-L). La supervivencia se valoró mediante el marcador para células humanas SC121; DAPI como tinción nuclear, magnificación 10X, barra de escala 250  $\mu$ m. (M). Gráfica de barras que muestra el total de ratas sometidas a trasplante celular (n=77), la proporción que tuvieron trasplante positivo para el marcador SC121 (SC121<sup>+</sup>; barra con relleno verde, se indica el porcentaje para cada grupo) y aquellas donde no se evidenció la presencia del marcador SC121 (SC121<sup>-</sup>; barra con relleno rojo). De cada grupo de animales trasplantados se especifica si fue un control de lesión usando solución salina (SS) o si corresponde al lesionado con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el tiempo en el cual se llevó a cabo la valoración, 15 días post-trasplante (15 dpt) o 2 meses post-trasplante (2 mpt).

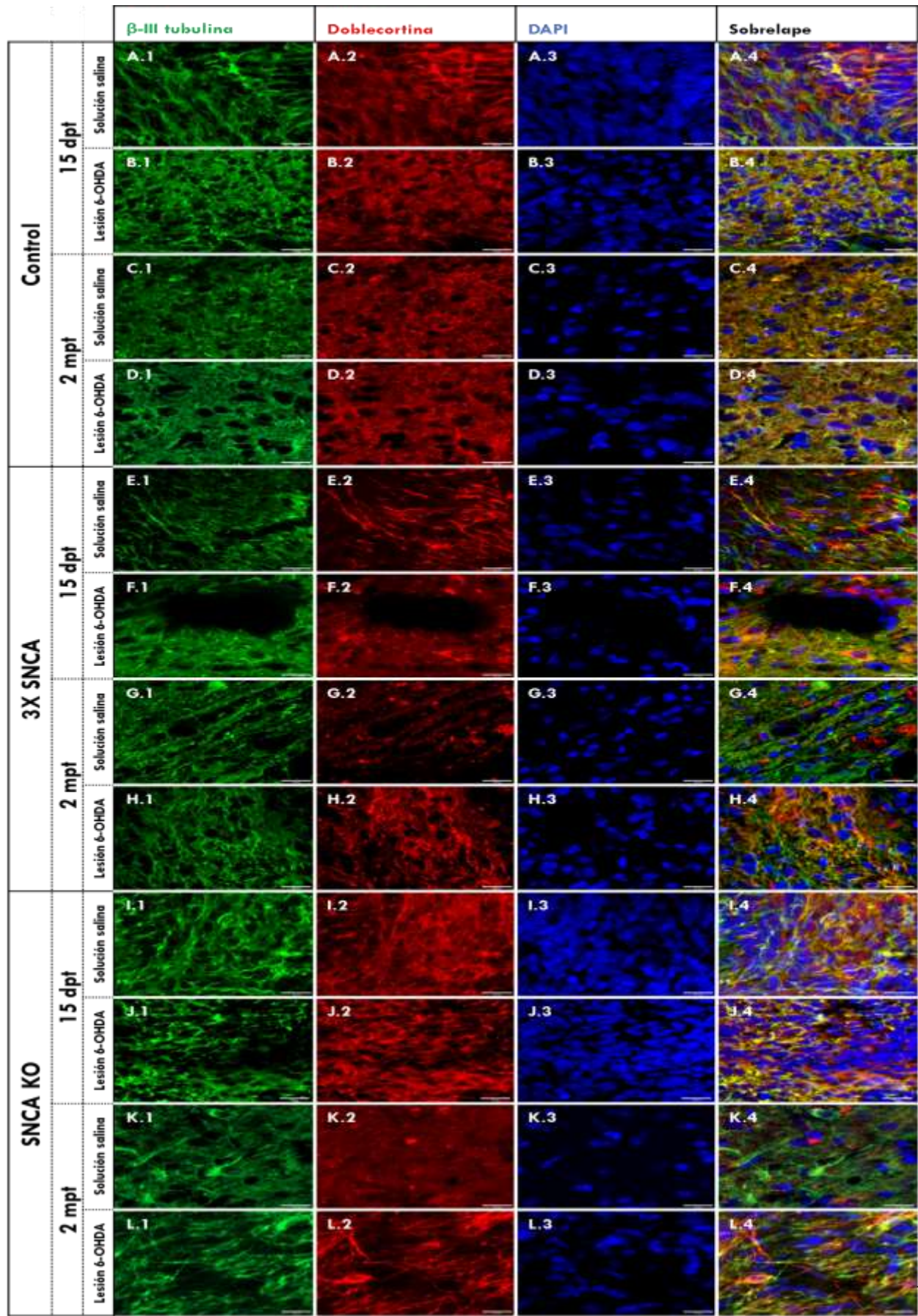
### 9.2.2 La SNpc lesionada es permisiva al mantenimiento neuronal de la línea 3X SNCA

Después de observar que las células trasplantadas en etapa de PP sobrevivían a los 15 dpt, evaluamos si permanecían con un fenotipo neuronal inmaduro caracterizado por el marcaje positivo a  $\beta$ -III tubulina y doblecortina ( $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>), similar al que se mostró en la **Figura 11**. Con este propósito analizamos cortes adyacentes a los analizados para SC121 (n= mínimo 2 cortes por grupo) mostrados en la **Figura 20**. Todos los cortes analizados tenían células con doble marcaje para  $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> (**Figura 21** y **Tabla anexa 2**). Aunque no cuantificamos, se observa un alto número de células con dicho marcaje, lo que nos indica que se encuentran todavía como células no totalmente diferenciadas.

A los 2 mpt no se observó diferencia en la expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina en comparación con el grupo a 15 dpt en la línea celular Control en el control de lesión con SS y con lesión con 6-OHDA (**Figura 21 A-D**). Remarcablemente, a 2 mpt, el 50% de los cortes SC121<sup>+</sup> analizados de las líneas celulares 3X SNCA y SNCA KO provenientes de ratas control de lesión con SS (**Figura 21 G** y **K**, respectivamente) presentaban células positivas para  $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup> (**Figura 21 G.1** y **K.1**) con una clara disminución en la expresión de doblecortina (**Figura 21 G.2** y **K.2**) (el 50% restante era  $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>) debido posiblemente a que las células se encuentran un proceso de maduración neuronal. Sin embargo, hace falta realizar la cuantificación celular de dichos

marcadores para indicar si existe diferencia significativa entre los 15 dpt y los 2 mpt. En contraste, en la SNpc lesionada con 6-OHDA, las células de estas 2 líneas si presentaban marcaje para doblecortina (**Figura 21 H.2 y H.4; L.2 y L.4**). Adicionalmente, tienen una morfología neuronal caracterizada por prolongaciones de tipo axónicas.

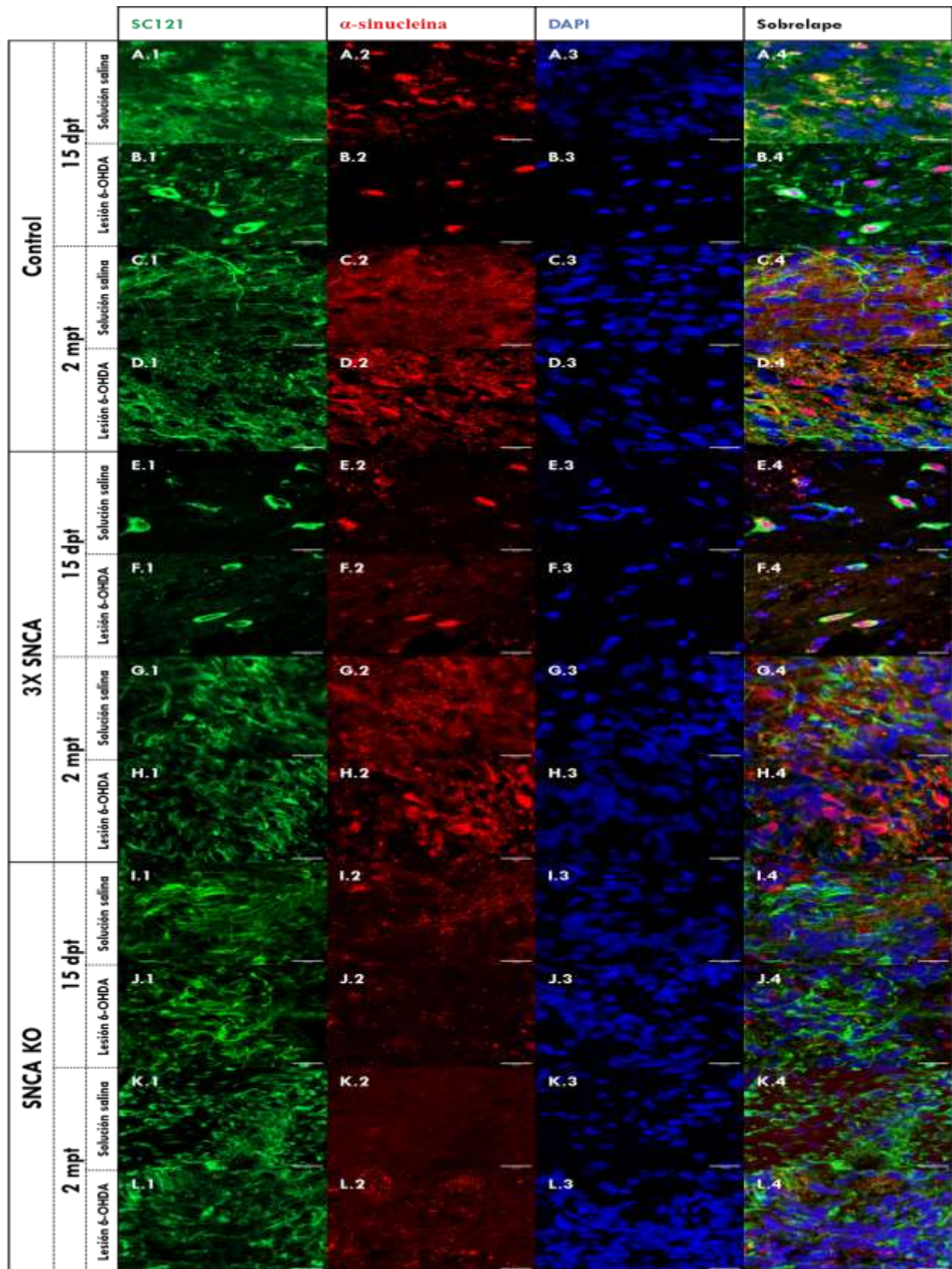
Por lo que, este resultado nos sugiere que es la SNpc no lesionada, la que está mediando estos eventos de mantenimiento neuronal de las líneas 3X SNCA y SNCA KO, no observados en la SNpc lesionada con 6-OHDA.



**Figura 21. Expresión a 15 días y 2 meses post-trasplante de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina de las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de placa de piso.** Imágenes representativas de las líneas Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (I-L). Como se puede apreciar, todas las condiciones estudiadas fueron positivas para  $\beta$ -III tubulina a 15 dpt y 2 mpt, tanto en la condición con solución salina como con 6-OHDA, aunque la expresión de doblecortina a 2 mpt se observa en mucho menor proporción en la línea celular 3X SNCA (G.2) y SNCA KO (K.2) trasplantadas en el modelo con solución salina. 15 días post-trasplante (15 dpt), 2 meses post-trasplante (2 mpt). DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

### 9.2.3 La línea celular 3X SNCA trasplantada en etapa de PP expresa $\alpha$ -sinucleína *in vivo*

Para determinar la presencia de  $\alpha$ -sinucleína en las células trasplantadas en etapa de PP efectuamos inmunofluorescencias con anticuerpos que reconocieran esta proteína. Lo hicimos a la par del marcador de células humanas SC121 para poder discernir entre la señal endógena y la proveniente del trasplante. Como se puede apreciar en la **Figura 22**, las líneas celulares Control y 3X SNCA y a 15 dpt muestran expresión de  $\alpha$ -sinucleína que incrementa a los 2 mpt, en tanto que la línea celular SNCA KO no expresa  $\alpha$ -sinucleína, únicamente se observa la señal endógena.



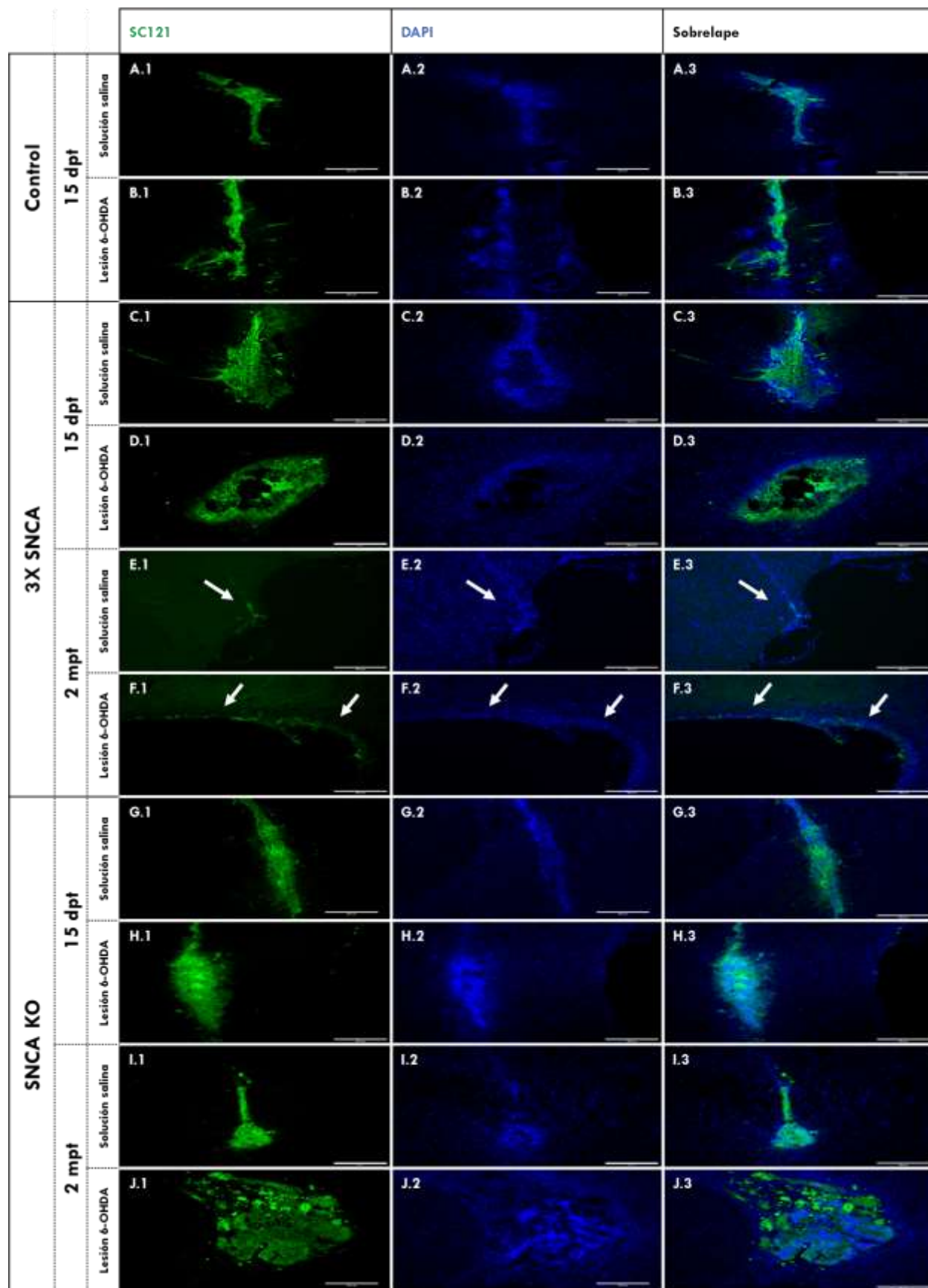
**Figura 22. Expresión de  $\alpha$ -sinucleína de las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de placa de piso a 15 días y 2 meses post-trasplante.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**I-L**) correspondientes a la expresión del marcador de células humanas SC121 y a  $\alpha$ -sinucleína. Las células de las líneas Control y 3X SNCA muestran expresión de  $\alpha$ -sinucleína, mientras que en las imágenes correspondientes a la línea celular SNCA KO únicamente exhiben la  $\alpha$ -sinucleína endógena del tejido trasplantado. DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

#### **9.2.4 La línea celular 3X SNCA trasplantada en el quinto día de la fase de maduración no muestra sobrevivencia a 2 meses post-trasplante**

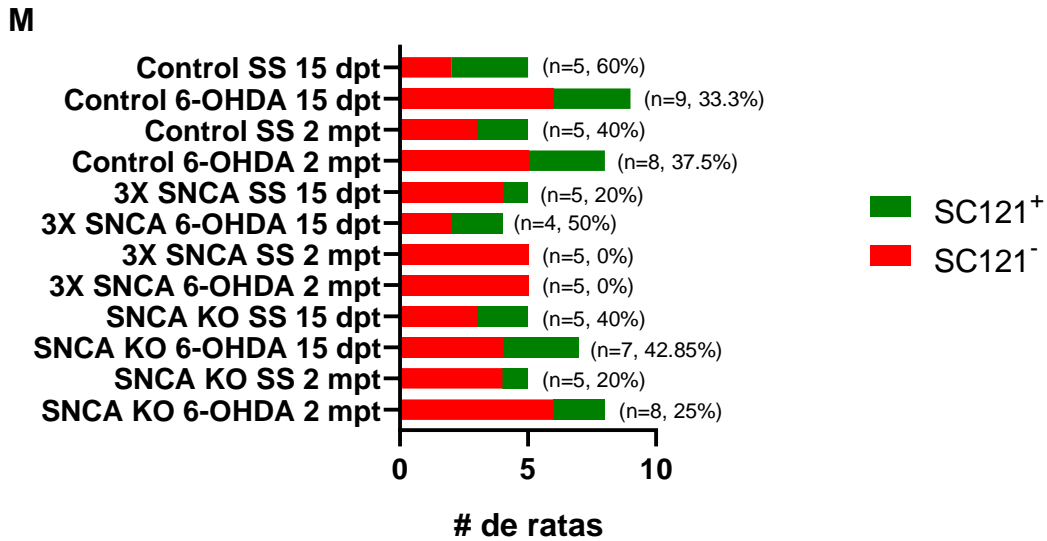
El siguiente paso fue valorar si neuronas que se encontraban en una etapa más avanzada de la diferenciación dopaminérgica, eran capaces de sobrevivir, así como de mantener y/o desarrollar el fenotipo dopaminérgico bajo las mismas condiciones evaluadas en la etapa de PP. Para ello, trasplantamos células que se encontraban en el quinto día de la fase de maduración del protocolo de diferenciación en cultivo (**Figura 8**).

Las líneas celulares Control y SNCA KO mostraron sobrevivencia a 15 dpt y 2 mpt en la SNpc en ambas condiciones, lesión con 6-OHDA y control de lesión con SS (**Figura 23 A-D e I-L**). La línea celular 3X SNCA únicamente mostró sobrevivencia a los 15 dpt (**Figura 23 M y Tabla anexa 3**). Además, fue la que tuvo la sobrevivencia más baja a 15 dpt en el control de lesión con SS, dado que solamente un encéfalo resultó SC121<sup>+</sup> (1 de 5 ratas), a la vez que en el modelo de lesión con 6-OHDA, únicamente 2 encéfalos fueron SC121<sup>+</sup> (2 de 5 ratas). En tanto, a 2 mpt en las dos condiciones, ningún encéfalo resultó SC121<sup>+</sup> (0 de 10 ratas). En el sitio correspondiente al trasplante se pueden apreciar cavitaciones (**Figura 23 E y F**, flechas blancas).

En contraste, observamos que todos los trasplantes de la línea celular Control a 2 mpt en ambas condiciones (SS y 6-OHDA) tenían dimensiones superiores a los trasplantes de las otras dos líneas celulares (resultado no mostrado). Este resultado sugiere que se inyectó un mayor número de células o que ocurrió una proliferación celular posterior al trasplante, indicando que parte de las células trasplantadas se encontraban en estado pluripotente.





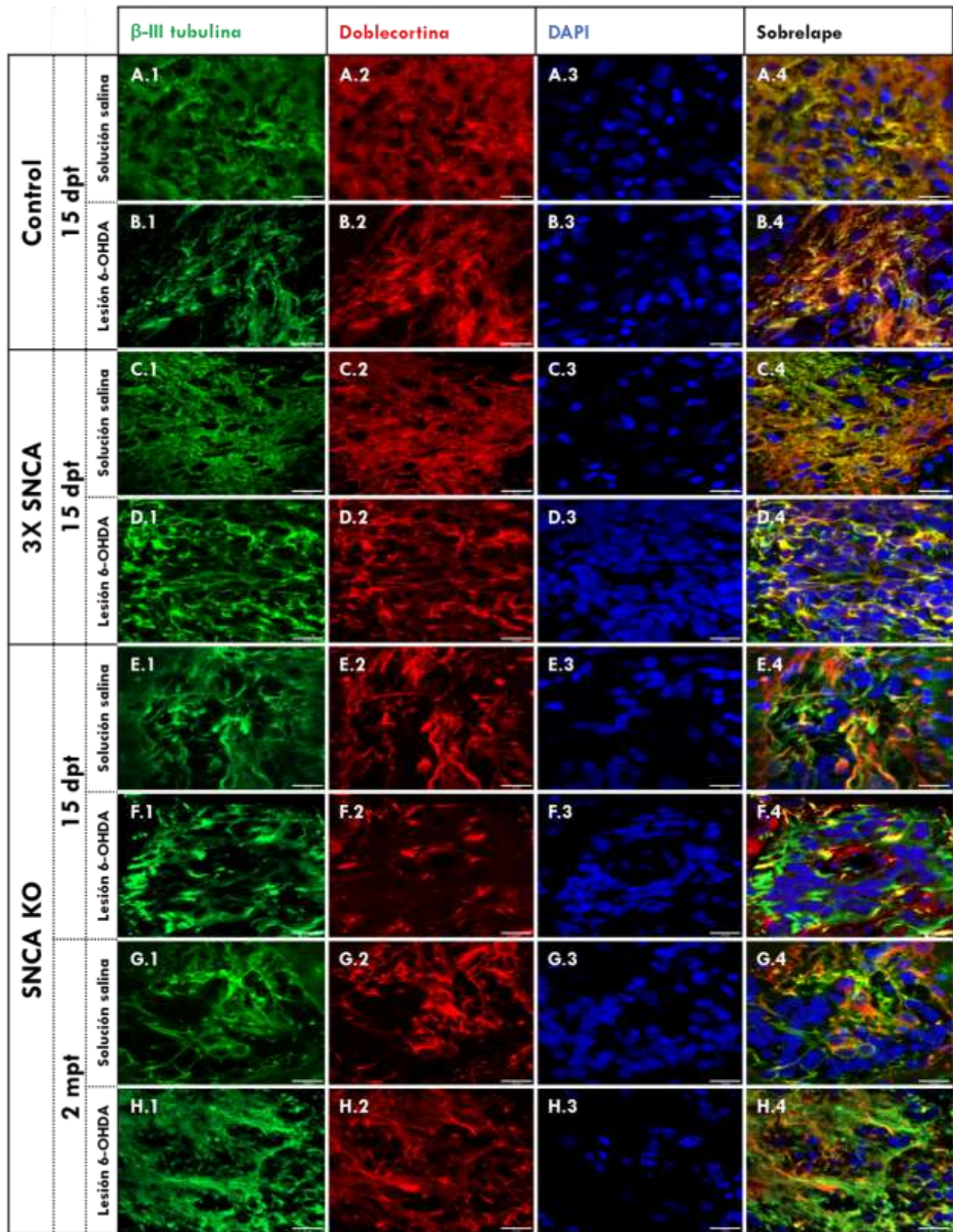


**Figura 23. Supervivencia a 15 días y 2 meses post-trasplante de las tres líneas celulares trasplantadas en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (A y B), 3X SNCA (C-F) y SNCA KO (G-J). Se muestra la supervivencia observada mediante el marcador para células humanas SC121; (E y F) cavitaciones señaladas con flechas blancas que se encontraron en los encéfalos de las ratas trasplantadas con la línea celular 3X SNCA tanto en el modelo con SS como con 6-OHDA, debido probablemente a un efecto negativo de la  $\alpha$ -sinucleína sobre la supervivencia. DAPI como tinción nuclear, magnificación 10X, barra de escala 250  $\mu$ m. (K) Gráfica de barras que muestra del total de ratas sometidas a trasplante celular (n=71), la proporción que tuvieron trasplante positivo para el marcador SC121 (SC121<sup>+</sup>, barra con relleno verde, se indica el porcentaje para cada grupo), y aquellas donde no se observó la presencia del marcador SC121 (SC121<sup>-</sup>, barra con relleno rojo). De cada grupo de animales trasplantados se especifica si corresponde al control de lesión con solución salina (SS) o a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), así como el tiempo en el cual se llevó a cabo la valoración, 15 días post-trasplante (15 dpt) o 2 meses post-trasplante (2 mpt).

### 9.2.5 La SNpc no facilita a 15 días y a 2 meses post-trasplante la maduración neuronal de las células trasplantadas en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica

Una vez que determinamos que las células en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica eran capaces de sobrevivir en la SNpc, valoramos la expresión de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina. Observamos que tanto a 15 dpt y 2 mpt ninguna de las 3 líneas mostró cambios apreciables de diferenciación (Figura 24 y Tabla anexa 3), similar a lo que mostraban las células en cultivo en la misma etapa (Figura 12).

Estos resultados indican que, si bien la SNpc permite la supervivencia neuronal a 15 dpt y 2 mpt, no pareciera ser un nicho que facilite por sí sola la maduración neuronal cuando las células se trasplantan el quinto día de la fase de maduración de nuestro protocolo de diferenciación dopaminérgica.

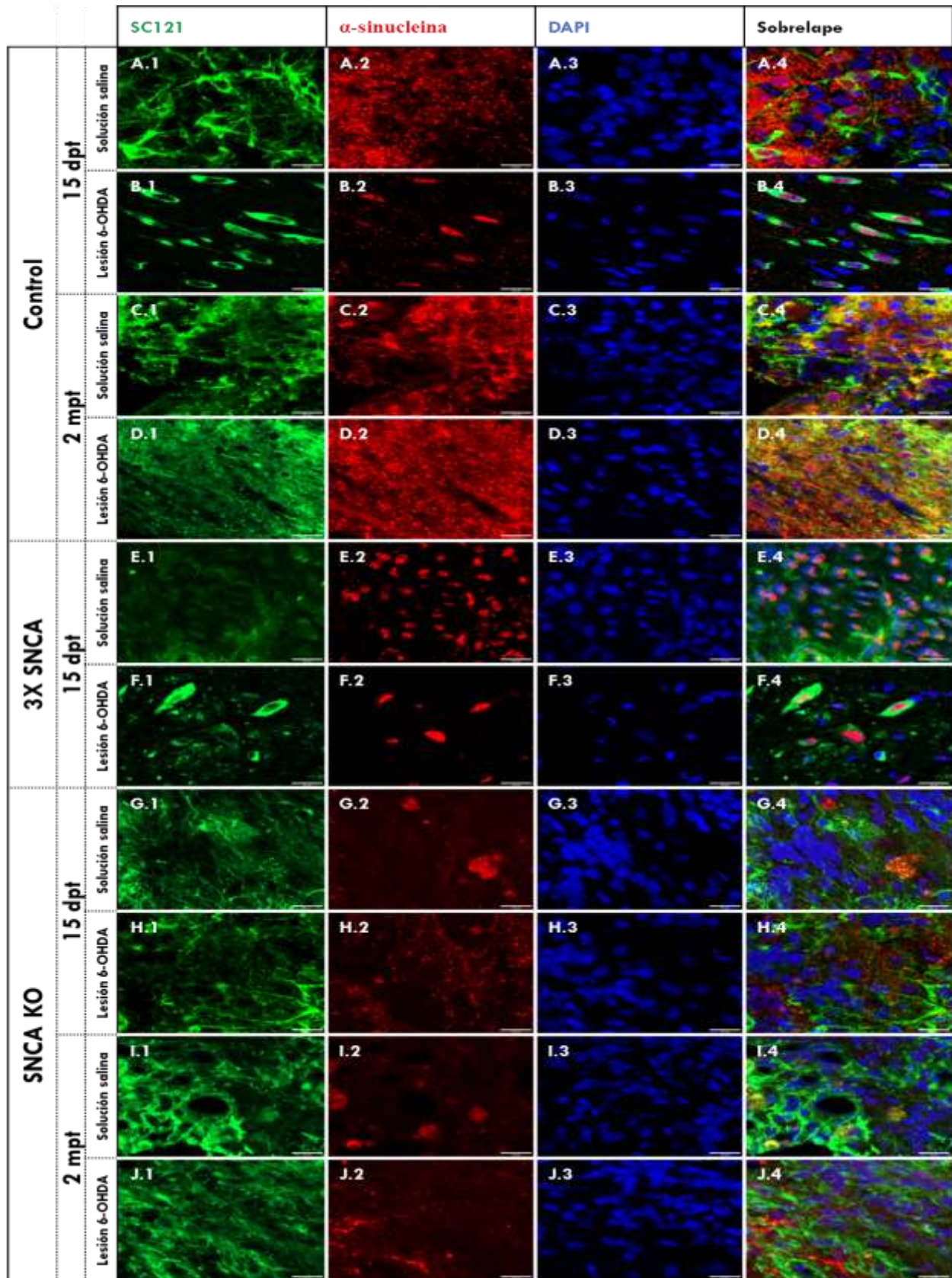


**Figura 24. Expresión a 15 días y 2 meses de  $\beta$ -III tubulina y doblecortina de las tres líneas celulares trasplantadas en el quinto día de la fase de maduración.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (A-D), 3X SNCA (E-H) y SNCA KO (I-L). Como se puede apreciar, todos los trasplantes fueron positivos para  $\beta$ -III tubulina y doblecortina a 15 dpt y 2 mpt, tanto en el modelo de rata lesionada con solución salina como con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), lo que indica que todavía permanecen como neuronas inmaduras o en proceso de maduración. 15 días post-trasplante (15 dpt) o 2 meses post-trasplante (2 mpt). DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

### **9.2.6 La línea celular 3X SNCA trasplantada en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica expresa $\alpha$ -sinucleína *in vivo***

De manera similar a lo realizado con las células de PP, evaluamos la presencia de  $\alpha$ -sinucleína en las células trasplantadas en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica de las líneas celulares 3X SNCA y Control, y su ausencia en la línea celular SNCA KO. Para ello, realizamos inmunofluorescencias contra dicha proteína junto al marcador de células humanas SC121 para poder discernir entre la señal endógena de la proveniente del trasplante celular.

Como se puede apreciar en la **Figura 25**, las células de las líneas celulares 3X SNCA y Control muestran expresión de  $\alpha$ -sinucleína, mientras que en las imágenes correspondientes a línea celular SNCA KO únicamente se observa la señal endógena.

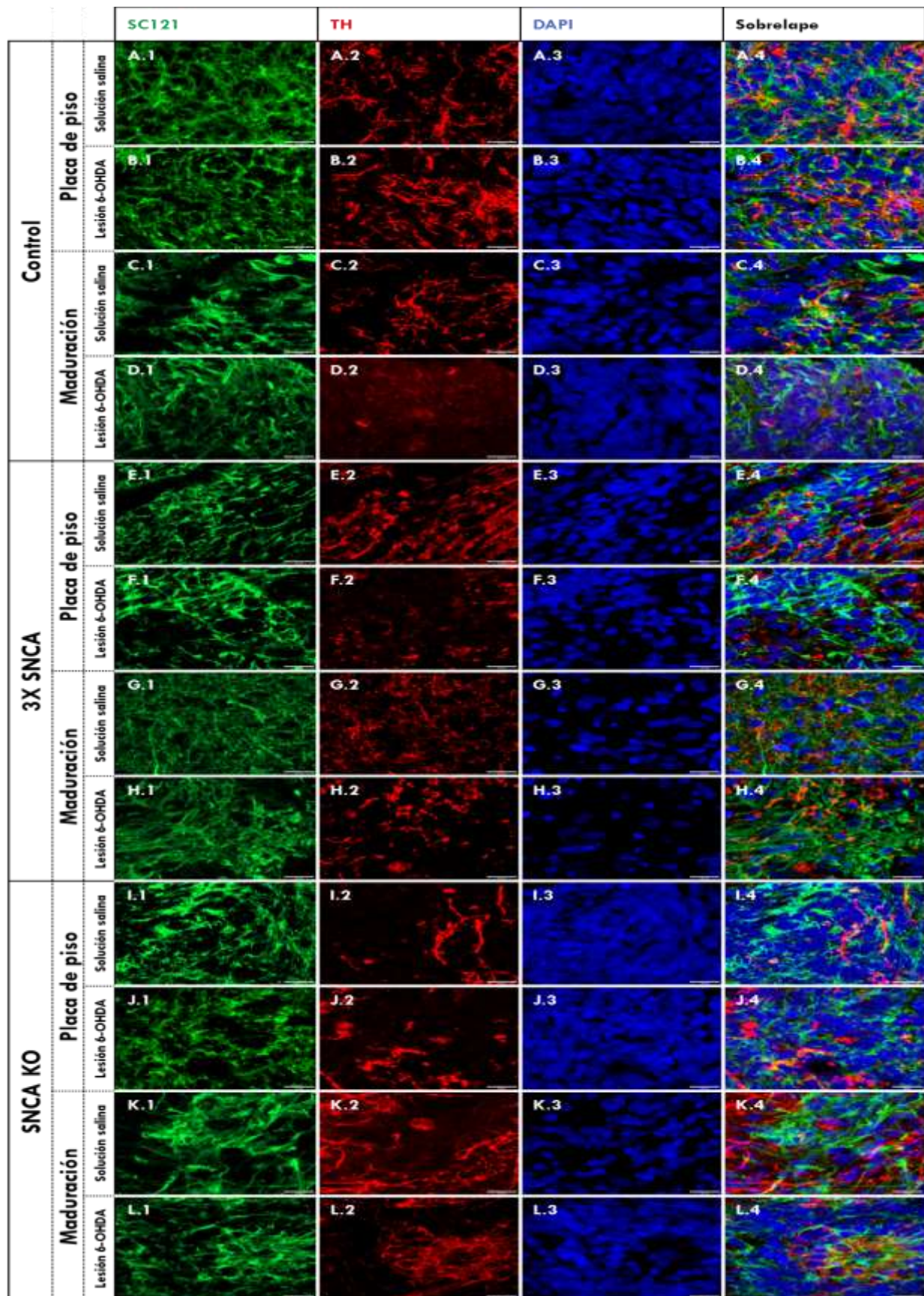


**Figura 25. Expresión de  $\alpha$ -sinucleína de las tres líneas celulares trasplantadas en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica a 15 días y 2 meses post-trasplante.** Imágenes representativas de las líneas celulares Control (**A-D**), 3X SNCA (**E y F**) y SNCA KO (**G-J**) correspondientes a la expresión del marcador de células humanas SC121 y a  $\alpha$ -sinucleína. Las células de las líneas Control y 3X SNCA muestran expresión de  $\alpha$ -sinucleína, mientras que en las imágenes correspondientes a la línea celular SNCA KO, la señal de  $\alpha$ -sinucleína no colocaliza con el marcador SC121. DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

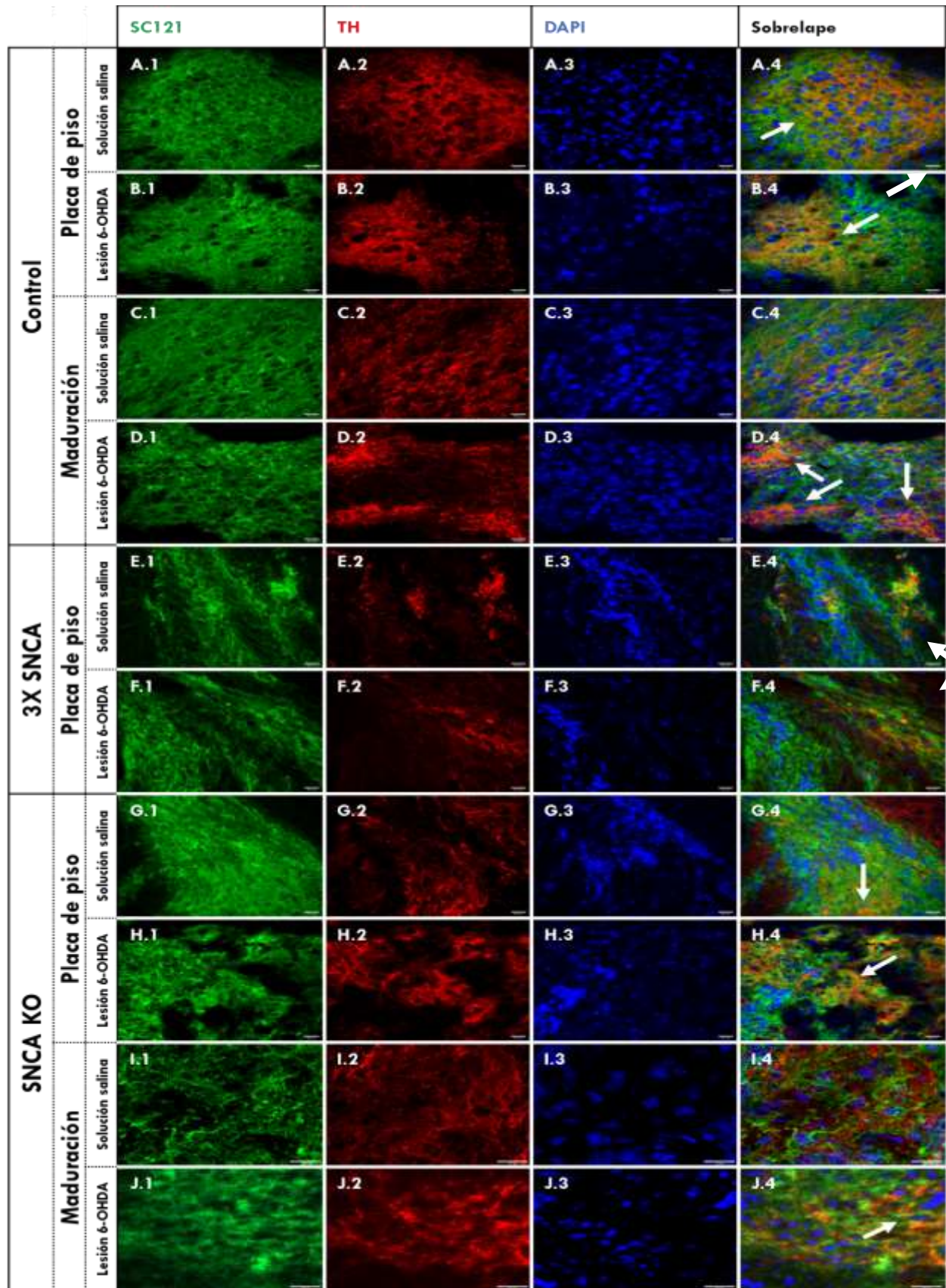
### **9.2.7 La expresión de TH es baja a 15 días y 2 meses post-trasplante en las células derivadas de la PP y del quinto día de la fase maduración dopaminérgica**

Por último, evaluamos la presencia del fenotipo dopaminérgico en los trasplantes mediante la expresión del marcador TH. Observamos su expresión en ambas condiciones de diferenciación analizadas, a lo largo de toda la zona trasplantada tanto a 15 dpt (**Figura 26**) como 2 mpt (**Figura 27**). Desafortunadamente, distinguir el doble marcaje de SC121-TH resultó complejo debido a la alta densidad celular en las zonas con implante, lo que a su vez dificultó distinguir los somas de las células y por lo tanto la cuantificación de las mismas. El marcaje más evidente se observó en las proyecciones celulares (**Figura 28**), por lo que realizamos una aproximación cuantitativa sobre los tejidos de 2 mpt utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Este permitió determinar el grado de correlación entre la presencia del marcador SC121 y TH, en el que, un valor de  $r=1$  corresponde a una correlación positiva perfecta,  $0 < r < 1$  a una correlación positiva, y  $r=0$  indica sin relación lineal.

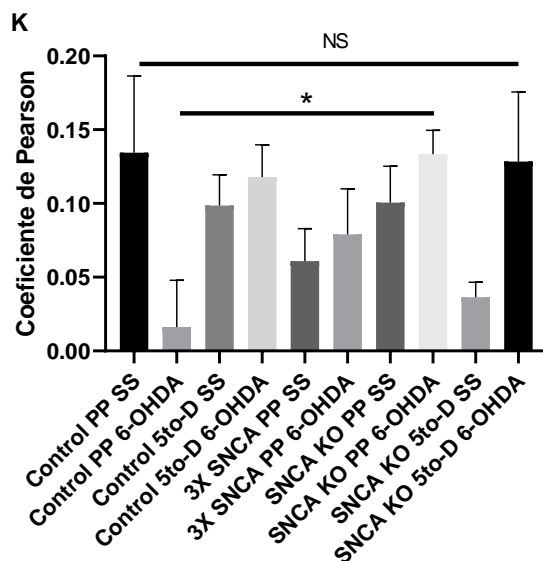
En todos las líneas celulares este valor fue menor a 0.2 tanto en la etapa de PP (**Figura 27 K y Tabla anexa 2**) como en el quinto día de la fase de maduración (**Figura 27 K y Tabla anexa 3**), lo que se categoriza como una correlación débil. Sin embargo, la presencia de señal de TH con baja correlación a SC121 no nos permite discernir si la expresión de TH observada corresponde a la ya presente en las células antes de ser trasplantadas (**Figuras 17 y 19**) y que lograron sobrevivir hasta el momento de la eutanasia o bien que las células que no tenían dicho marcador lograron la diferenciación dopaminérgica a 2 mpt, debido a que no logramos determinar un aumento.



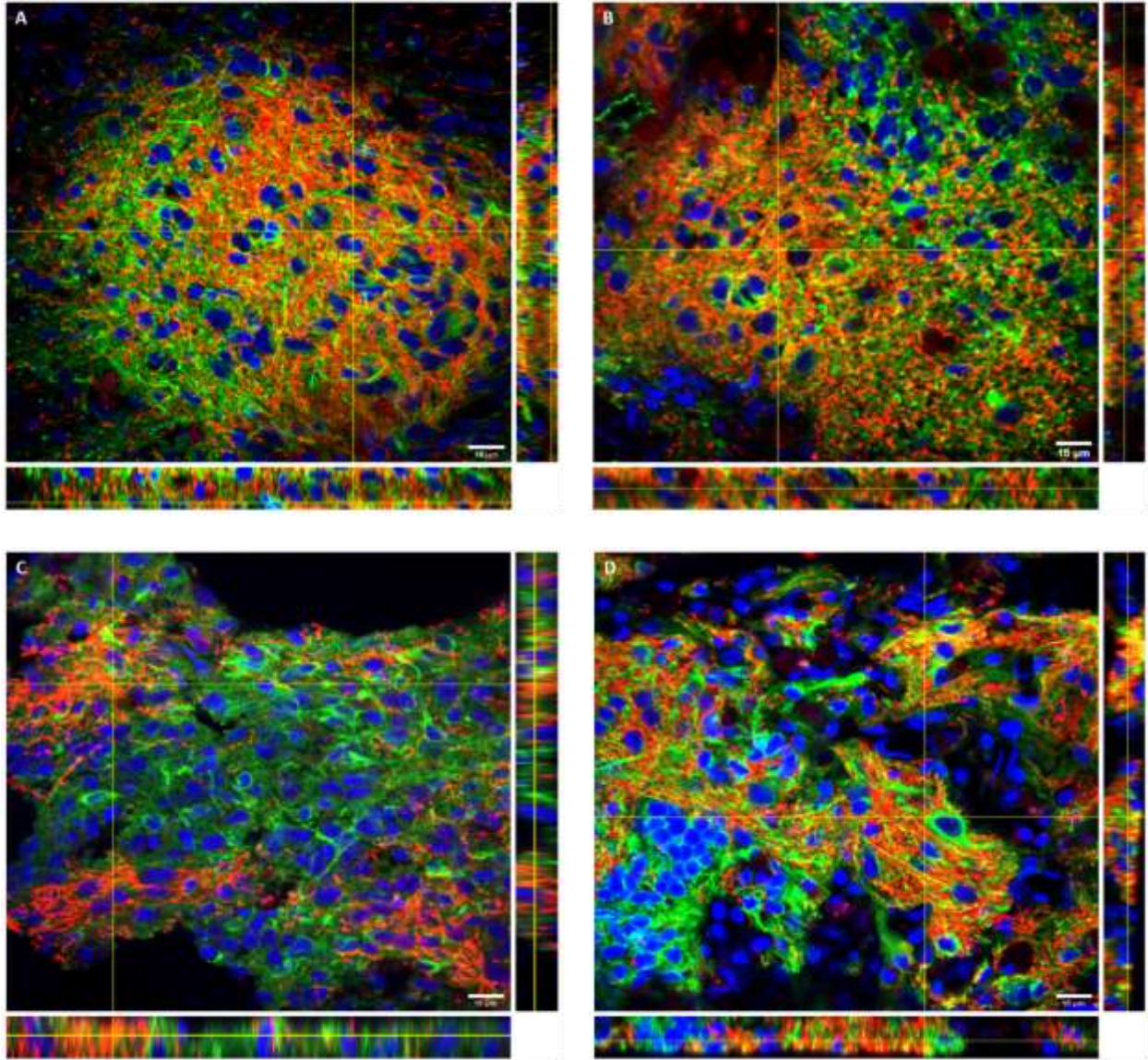
**Figura 26. Expresión de tirosina hidroxilasa de las tres líneas celulares a 15 días post-trasplante.** Imágenes representativas de las líneas Control (**A-D**), 3X SNCA (**E-H**) y SNCA KO (**I-L**) donde se muestra la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) de las células trasplantadas en etapa de placa de piso y en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica evaluadas 15 días post-trasplante (dpt). Se utilizó el marcador para células humanas SC121, para poder identificar a las células trasplantadas (primera columna). Como se puede observar, en las zonas correspondientes a los trasplantes (segunda columna) hay señal de TH, la cual es más notoria en los trasplantes realizados en el modelo con solución salina; no obstante, en las imágenes correspondiente al sobrelape (cuarta columna) se aprecia un bajo número de células con colocalización de la señal. Por lo tanto a los 15 dpt las células aún no desarrollan un fenotipo dopaminérgico. DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu\text{m}$ .







**Figura 27. Expresión de tirosina hidroxilasa de las tres líneas celulares a 2 meses post-trasplante.** Imágenes representativas de las líneas Control (A-D), 3X SNCA (E y F) y SNCA KO (G-J) donde se muestra la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) evaluada 2 meses post-trasplante (mpt) de las células trasplantadas en etapa de placa de piso (PP) y en el quinto día de la fase maduración dopaminérgica (5to-D) en control de lesión con solución salina (SS) o lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Se utilizó el marcador para células humanas SC121 para identificar las células trasplantadas (primera columna), en las que se puede observar señal de TH (segunda columna), la que colocaliza sólo en ciertas zonas con la señal de SC121 (indicado por las flechas blancas); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu\text{m}$ . (K) Gráfica de barra que muestra el coeficiente de Pearson por grupo, indicando la correlación entre la expresión de TH y SC121 y, por lo tanto, el grado de mantenimiento o desarrollo del fenotipo dopaminérgico por parte de las células trasplantadas. SNpc control de lesión con SS y células de PP: Control  $0.13 \pm 0.05$ , 3X SNCA  $0.060 \pm 0.02$  y SNCA KO  $0.10 \pm 0.02$ ; SNpc lesionada: y células de PP: Control  $0.016 \pm 0.03$ , 3X SNCA  $0.079 \pm 0.03$  y SNCA KO  $0.13 \pm 0.01$ . SNpc control de lesión con SS y células del quinto día de la fase de maduración: Control  $0.098 \pm 0.02$ , 3X SNCA: sin sobrevivencia, SNCA KO  $0.016 \pm 0.01$ ; SNpc lesionada y células del quinto día de la fase de maduración: Control  $0.11 \pm 0.02$ , 3X SNCA: sin sobrevivencia, SNCA KO  $0.12 \pm 0.04$ . La barra de error indica el error estándar de la media ( $\pm\text{EEM}$ ), la cual fue obtenida de por lo menos 2 campos de cada encéfalo positivo a SC121 a 2 mpt. Se empleó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis. Únicamente hubo diferencia significativa entre la línea celular Control trasplantada en etapa de PP en el control de SS 0.9% y la línea celular 3X SNCA trasplantada en etapa de PP en el modelo de 6-OHDA ( $*p < 0.05$ ).



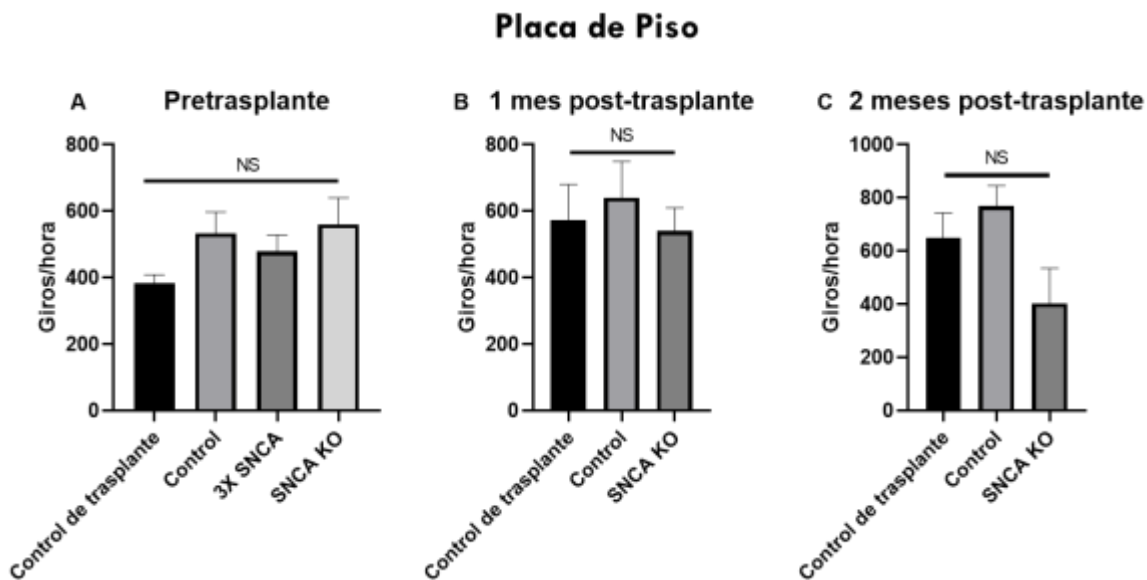
**Figura 28. Expresión de tirosina hidroxilasa a 2 meses post-trasplante.** Imágenes representativas de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) y SC121 de la línea Control trasplantada en etapa de placa de piso (PP) en el control con solución salina (**A**) y en el modelo con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (**B**), así como trasplantada en el quinto día de la fase de maduración en el modelo con 6-OHDA (**C**). Línea SNCA KO trasplantada en etapa de PP en modelo de lesión con 6-OHDA (**D**). Como se puede apreciar, la señal de TH es abundante en las mismas regiones donde se encuentra en el marcador para células humanas SC121. Sin embargo, en las imágenes ortogonales no se aprecia que colocalicen las señales a nivel de soma, únicamente en las proyecciones como se indica. DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15 µm.

### 9.2.8 El trasplante celular no mejora la conducta motora en los animales lesionados

Con el objetivo de determinar si los trasplantes celulares eran funcionales, se valoró el comportamiento motor mediante la prueba de giro inducida por anfetamina en los grupos destinados a 2 mpt, incluyendo como control a un grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA (n=5) a las que se les administró PBS en lugar de células.

Los datos de comportamiento se recabaron 1 y 2 mpt (un día antes de la eutanasia) en las ratas con trasplantes en etapa de PP y del quinto día de la fase de maduración dopaminérgica. Los valores obtenidos se compararon con la conducta motora obtenida una semana previa al trasplante celular, que es el nivel de comportamiento basal. El comportamiento motor de la línea 3X SNCA no fue cuantificado debido a problemas con la adquisición del comportamiento motor.

No se encontró un cambio significativo en la disminución de la conducta de giro a 1 ó 2 mpt, en las ratas con trasplantes en etapa de de PP que indique por lo tanto, una mejoría en la conducta motora (**Figura 29**).

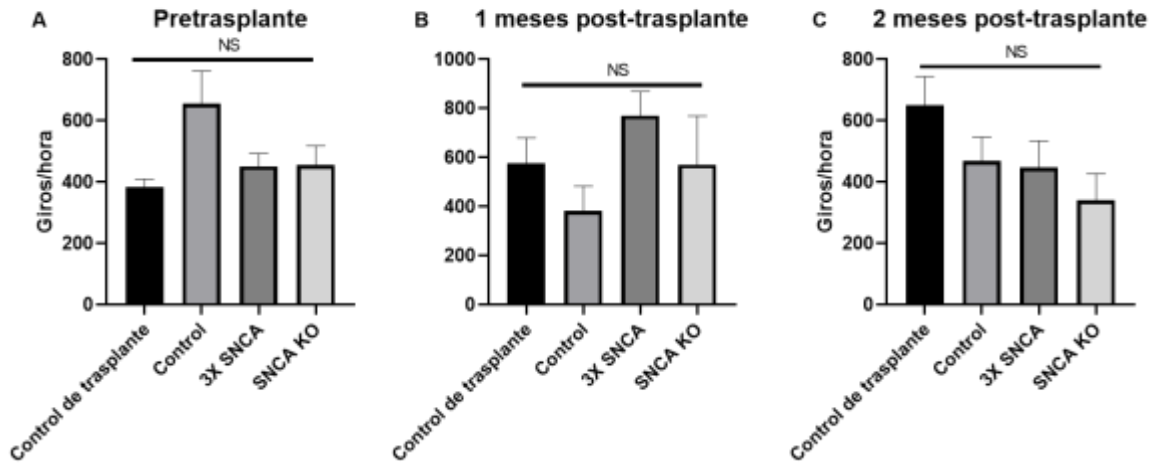


**Figura 29. Prueba de giro inducida por anfetamina en ratas con trasplante celular en la etapa de placa de piso.** No se encontró diferencia significativa en la conducta motora al comparar los registros de 1 mpt y 2 mpt con el control de trasplante. **(A)** Pretrasplante: Control de trasplante  $384.22 \pm 36.78$ , Control  $533.8 \pm 63.70$ , 3X SNCA  $479.3 \pm 50.04$ , SNCA KO  $560.6 \pm 78.81$ ; ANOVA de una vía,  $p=0.3183$ ,  $F = 1.234$ ,  $r^2 = 0.1290$ . **(B)** 1 mpt: Control de trasplante  $574.4 \pm 105.9$ , Control  $640.0 \pm 109.8$ , SNCA KO  $541.3 \pm 69.15$ ;  $p=0.7384$ ,  $F = 0.3085$ ,  $r^2 = 0.0331$ . **(C)** 2 mpt: Control de trasplante  $650.2 \pm 93.39$ , Control  $769.3 \pm 77.16$ , SNCA KO  $404.1 \pm 130.9$ ;  $p=0.0574$ ,  $F = 3.364$ ,  $r^2 = 0.2721$ . Barra de error indica el error estándar de la media; NS, no significativo.

De manera similar, tampoco se observó diferencia significativa en el comportamiento motor entre los grupos con los trasplantes realizados con las células del quinto día de la fase de maduración dopaminérgica (**Figura 30**). En conjunto, estos resultados indican que las tres líneas celulares a 2

mpt, a pesar de la sobrevivencia en la SNpc, no han logrado una maduración e integración dopaminérgica que se traduzca en una mejoría del comportamiento motor.

### Quinto día de la fase maduración



**Figura 30. Prueba de giro inducida con anfetamina en ratas trasplantadas con células en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica.** No se encontró diferencia significativa en la conducta motora al comparar los registros de 1 mpt y 2 mpt con el control de trasplante. **(A)** Pretrasplante, Control de trasplante  $384.22 \pm 36.78$ , Control  $655.8 \pm 105.8$ , 3X SNCA  $450.8 \pm 42.26$ , SNCA KO  $454.9 \pm 63.49$ ; ANOVA de una vía,  $p=0.0994$ ,  $F = 2.357$ ,  $r^2 = 0.2432$ , 1 mpt. **(B)** 1 mpt: Control de trasplante  $574.4 \pm 105.9$ , Control  $381.9 \pm 101.1$ , SNCA  $771.2 \pm 97.28$  y SNCA KO  $570.3 \pm 199.4$ ;  $p=0.3746$ ,  $F = 1.089$ ,  $r^2 = 0.1293$ . **(C)** 2 mpt: Control de trasplante  $650.2 \pm 93.39$ , Control  $468.6 \pm 77.76$ , SNCA  $446.8 \pm 87.58$  y SNCA KO  $339.4 \pm 87.59$ ;  $p=0.1436$ ,  $F = 1.999$ ,  $r^2 = 0.2142$ . Barra de error indica el error estándar de la media; NS, no significativo.

## 10. Discusión

### 12.1 $\alpha$ -sinucleína y la diferenciación dopaminérgica *in vitro*

En este trabajo empleamos un protocolo de cultivo basado en la inhibición dual de la vía SMAD a través de moléculas pequeñas, que entre los tipos de protocolos de diferenciación dopaminérgica es el que de forma reproducible tiene el mayor número de células TH<sup>+</sup> [106-108]. Los mayormente usados hasta ahora tienen porcentajes de diferenciación heterogéneos. Aquellos que pasan por la formación de CE pueden tener desde 30% hasta 80% de neuronas TH<sup>+</sup> [39, 100-104]. Mientras que los fundamentados en la formación de roseta neural tienen un rango de neuronas dopaminérgicas que va de 15% a 80% [38, 97, 98]. Si bien los protocolos basados en la diferenciación a partir de FT logran una eficacia mayor al 75% [103, 143-145], en este proyecto no era factible su uso debido a que nuestro objetivo era valorar la importancia del estadio celular en la diferenciación dopaminérgica directamente en la SNpc.

En la etapa de PP las células mostraban un fenotipo  $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>, que las describe como neuroblastos y neuronas inmaduras [141], sin que aún alcancen un fenotipo dopaminérgico mesencefálico, ya que se obtuvo un bajo porcentaje de células LMX1 $\alpha$ <sup>+</sup> y TH<sup>+</sup>, que si bien no fue estadísticamente diferente entre las líneas estudiadas, si muestra una tendencia a disminuir en las líneas 3X SNCA y SNCA KO.

Con respecto al marcador Lmx1 $\alpha$  esta descrito que es necesario y suficiente para la diferenciación dopaminérgica mesencefálica [85]. Además, su sobreexpresión en ESC de ratón resulta en el desarrollo de este fenotipo en cultivo [146], ya que es un regulador positivo de la expresión de NURR1 y Pitx3, que a su vez son reguladores positivos de la expresión de TH [86-89]. Lo que explica porqué el porcentaje de células Lmx1 $\alpha$ <sup>+</sup> se correlaciona con el porcentaje de células TH<sup>+</sup> en cada tiempo estudiado (PP, quinto y decimoquinto día de la fase de maduración dopaminérgica) en las tres líneas celulares (**tabla anexa 1**), con excepción de la línea Control en el decimoquinto día, lo que se discute a profundidad en los siguientes párrafos.

Si bien en la mayoría de los estudios que usan un protocolo de inhibición dual de la vía SMAD usando moléculas pequeñas no se especifica si hay células TH<sup>+</sup> en la etapa de PP, hay dos que sí lo hacen. Por un lado, Xia *et al.* indica que no hay presencia de células TH<sup>+</sup> en la etapa de PP [147], en contraste Fedele *et al.* cuantificaron  $8.06 \pm 2.45\%$  células TH<sup>+</sup> en la misma etapa [106] (resultados similares a los nuestros, **Tabla anexa 1**). La diferencia podría radicar en que en el protocolo del primer estudio no se realizaron pasajes de las células de esta etapa, mientras que en el segundo estudio se dieron como mínimo 6 pasajes, por lo que la presencia de células TH<sup>+</sup> puede deberse al mayor tiempo que las células permanecen con los medios de inducción de células de PP.

En nuestros resultados, la línea celular Control fue la que tuvo el mayor porcentaje de células TH<sup>+</sup> en PP (7.35%) y en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica (59.62%). Sin embargo, este número disminuyó hasta un 24.75% al final del protocolo de diferenciación dopaminérgica,

lo que podría parecer contraintuitivo, pero existe evidencia de que la administración sostenida y prolongada de GDNF presente en el cultivo puede disminuir la expresión de TH en neuronas dopaminérgicas intactas sin que exista alteración de su funcionalidad, en razón de que el GDNF aumenta la excitabilidad neuronal, llevando a un incremento en la liberación de dopamina que conduce a la sobre activación de los autorreceptores para dopamina y como un mecanismo de retroalimentación se disminuye tanto la expresión de TH como su fosforilación, aminorando su actividad enzimática [148, 149].

Para probar esta hipótesis sería necesario cuantificar la cantidad de dopamina *in vitro* mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y el nivel de TH fosforilada mediante western blot. Por otro lado, sería oportuno comparar este resultado con otra línea control usando el mismo protocolo de diferenciación dopaminérgica, ya que las otras dos líneas celulares empleadas lograron un porcentaje de células TH<sup>+</sup> más próximo a lo reportado en la literatura, para poder distinguir si este bajo porcentaje se debió a la propia línea o a la metodología empleada.

Al final del protocolo de diferenciación dopaminérgica la línea celular 3X SNCA tuvo 48.14% de células TH<sup>+</sup>. En este sentido existe evidencia contrastante en la literatura. En primer lugar porque usando otros protocolos de diferenciación dopaminérgica con la misma línea celular, el porcentaje de TH<sup>+</sup> es menor al 5% [38, 39]. Mientras que usando una línea celular portadora de la 3X SNCA diferente a la nuestra, con un protocolo de diferenciación dopaminérgica basado en la inhibición dual de la vía SMAD se obtiene un porcentaje de células TH<sup>+</sup> del 37% (control 28%) [123]. Este porcentaje no fue significativamente diferente al grupo control, aunque si se puede observar cierta tendencia de la 3X SNCA a un mayor porcentaje de células TH<sup>+</sup>, similar a lo reportado por nosotros (3X SNCA 48.14% y Control 24.76%). El mayor porcentaje podría ser debido a diferencias metodológicas en los protocolos de diferenciación empleados, que como se ha mencionado, son determinantes en el número de neuronas dopaminérgicas generadas.

Otro punto que destacar de la línea 3X SNCA al final del protocolo de diferenciación dopaminérgica es el hecho de que el 69.35% de las células TH<sup>+</sup> también expresaban  $\alpha$ -sinucleína<sup>+</sup>, en comparación al 41.95% de la línea Control. Lo anterior indica que la 3X SNCA conduce tanto a una mayor transcripción del RNA mensajero como en la expresión de la  $\alpha$ -sinucleína en neuronas dopaminérgicas [32, 38, 39, 150], que si bien no tiene algún efecto negativo apreciable en condiciones basales *in vitro*, si confieren susceptibilidad ante eventos estresantes (ej. ROS, privación de glucosa), que en última instancia pueden conducir a la degeneración y muerte celular [32, 38-40].

Si bien en la línea celular 3X SNCA el porcentaje de células TH<sup>+</sup> fue mayor en comparación a la línea Control, no se puede descartar un efecto de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína sobre la funcionalidad de la TH en nuestros cultivos, esto debido a que se ha demostrado que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína activa a la proteína fosfatasa 2A en neuronas dopaminérgicas, con lo que se inhibe la fosforilación del residuo de serina 40 de la TH (TH ps40), la cual es necesaria para su correcta actividad, lo que conlleva a una disminución en la síntesis de dopamina [151,

152]. Para poder valorar este fenómeno es necesario que llevemos a cabo inmunofluorescencias y western blots específicos para la TH ps40, así como la medición de las concentraciones de dopamina mediante HPLC.

En conjunto nuestros resultados *in vitro* sugieren que la triplicación del locus del gen SNCA que codifica para  $\alpha$ -sinucleína podría no estar interfiriendo con la diferenciación dopaminérgica. Sin embargo, como discutiremos a detalle más adelante, *in vivo*, la línea 3X SNCA es la más afectada en su capacidad de sobrevivencia, lo que podría indicar que existen cambios celulares que no es posible visualizar en cultivo.

De manera interesante, con la línea celular SNCA KO se observó una tendencia de producir el mayor porcentaje de células TH<sup>+</sup> (62.18%) (estadísticamente significativa con la línea Control, pero no así con la línea 3X SNCA). Este resultado está en acuerdo a un reporte que señala que el *knockdown* del gen SNCA en la línea 3X SNCA era capaz de revertir parcialmente los efectos negativos de dicha mutación (ej. disminución del fenotipo dopaminérgico y prolongaciones neuronales) [39]. La mayor presencia de células TH<sup>+</sup> en la línea SNCA KO, podría estar relacionada con la regulación negativa de los genes de diferenciación dopaminérgica que se produce con la sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína: *DLK1*, *GABABR2*, *NURR1*, *GIRK-2* y *TH* [39].

En este sentido, el gen que codifica para NURR1 tiene gran relevancia, debido a que es un FT expresado en la etapa final del desarrollo dopaminérgico mesencefálico, estadio en el que la línea SNCA KO mostró el mayor número de células TH<sup>+</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que NURR1 induce la expresión de TH, Vmat y DAT [39, 64, 93-95, 128, 153], así como que existe una relación inversa entre la cantidad de mRNA de  $\alpha$ -sinucleína y NURR1 [154]. También se ha demostrado *in vitro* que el silenciamiento de la expresión de  $\alpha$ -sinucleína mediada por RNA de interferencia incrementa la presencia de TH ps40, conduciendo a una mayor concentración de 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) y dopamina [155], por lo que la disminución en la expresión de  $\alpha$ -sinucleína pudiera ser un blanco terapéutico factible en etapas tempranas de la EP.

Por todo lo anterior, es posible que el efecto observado *in vitro* de una tendencia hacia un mayor número de células TH<sup>+</sup> en la línea SNCA KO, pudiera explicarse por el incremento en la expresión de genes vinculados con la diferenciación dopaminérgica producido por el cese del efecto de regulación negativa ejercido por la  $\alpha$ -sinucleína.

En consecuencia, se necesita determinar cuáles son los mecanismos moleculares/bioquímicos que vinculan a la  $\alpha$ -sinucleína con los factores de transcripción implicados en la diferenciación dopaminérgica, para conocer si sus efectos sobre las neuronas dopaminérgicas pudieran ocurrir desde una etapa temprana del desarrollo.

## 10.2 Trasplantes celulares en la SNpc

Los estudios enfocados en trasplantes celulares en los diversos modelos animales de la EP son mayormente con fines terapéuticos. Tienen como objetivos principales mejorar la sobrevivencia del trasplante y su funcionalidad, que son evaluados mayormente a través de la recuperación del comportamiento motor [63, 65, 109, 117, 156-158]. Sin embargo, hasta ahora no se han obtenido resultados satisfactorios que permitan que los trasplantes celulares sean usados como tratamiento clínico de forma rutinaria. Los estudios como el planteado en este proyecto permiten un mayor conocimiento básico en ese sentido.

Otro enfoque del que se retomó su estudio recientemente es el trasplante celular en la SNpc, sitio ontogénico de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y donde ya se ha reportado la presencia de neurogénesis [159-162]. Aunque, todavía son pocos los estudios relacionados con la capacidad de la SNpc adulta como sitio que permita el desarrollo dopaminérgico [63, 120, 146, 163, 164]. El fundamento de este acercamiento radica en que la sobrevivencia del trasplante junto con una correcta reinervación de la vía nigroestriatal debería proporcionar una mejor condición para el restablecimiento de las funciones motoras [146].

Resultados obtenidos por nuestro grupo señalan que la SNpc intacta de rata es permisiva al desarrollo neuronal pero no para el desarrollo del fenotipo dopaminérgico mesencefálico cuando ESC de ratón son trasplantadas en etapa de CE [120]. Sin embargo, logran transitoriamente la diferenciación dopaminérgica cuando las ESC de ratón sobreexpresan el FT *Lmx1a* [146] o cuando hESC sobreexpresan tres FT implicados en la diferenciación dopaminérgica mesencefálica (*Lmx1a*, *FoxA2* y *Otx2* (LFO)) (Ramos-Acevedo *et al.*, en escritura). Interesantemente, se ha conseguido la conversión de astrocitos a neuronas a través de la inhibición de la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB, implicada en la supresión de la inducción neuronal), el subtipo neuronal depende de la localización de los astrocitos y por lo tanto del microambiente al que están expuestos. En el caso de la SNpc lesionada con 6-OHDA se obtiene la restauración de aproximadamente un tercio del número inicial de neuronas dopaminérgicas *Lmx1a*<sup>+</sup>/*FoxA2*<sup>+</sup>/*TH*<sup>+</sup>, que han podido reinervar el núcleo estriado con mejoría en el comportamiento motor [164].

En este estudio nos centramos en analizar la permisividad de la SNpc, ahora con el uso de hiPSC en dos estadios de diferenciación dopaminérgica siguiendo un protocolo de inhibición dual de la vía SMAD usando moléculas pequeñas. Para profundizar en la diferenciación dopaminérgica *in vivo*, en nuestro estudio incluimos una línea de hiPSC proveniente de un paciente con EP originada por la 3XSNCA.

Observamos que las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de PP tanto a 15 dpt como a 2 mpt, logran sobrevivir y permanecer como neuronas inmaduras ( $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>). De manera interesante, a 2 mpt en las líneas 3X SNCA y SNCA KO en la SNpc control de lesión se aprecia una disminución en la expresión de doblecortina, indicando que probablemente se encuentran en un proceso de maduración neuronal. Sin embargo, para demostrarlo conclusivamente es necesario su cuantificación y comparación contra los 15 dpt, así como, analizar marcadores de diferenciación



neuronal terminal como NeuN o la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) [141, 165]. También es conveniente evaluar el trasplante de estas células en otra estructura anatómica (ej. núcleo estriado) para valorar la contribución de cada factor (estructura anatómica vs. línea celular vs. estadio del trasplante) a la maduración neuronal.

Asimismo, cualitativamente las células de la línea 3X SNCA mostraron un trasplante de menor dimensión, es decir, menor sobrevivencia. En comparación, la sobrevivencia del trasplante de las líneas en etapa de diferenciación más avanzada (quinto día del protocolo de diferenciación dopaminérgico) fue mucho menor o nula en algunos casos comparado a la etapa de PP (**Tablas anexas 1 y 2**).

Por lo tanto, la mayor sobrevivencia en una etapa temprana, podría explicarse porque las células en esta etapa tienen la capacidad de dividirse [106] y, aunque mueran células, cierto número de ellas logra sobrevivir, lo que podría dar lugar a nuevas células de PP. En relación con esto, existen cuestionamientos acerca de la capacidad de que las células trasplantadas que no se encuentren totalmente diferenciadas, tengan una división celular excesiva o inclusive formen tumores [65, 166, 167]. Sin embargo, en los trasplantes que realizamos en etapa de PP no presenciamos tales eventos celulares.

En el contexto de los trasplantes realizados en la SNpc con fines de investigación terapéutica, la evidencia es heterogénea, por un lado Grealish *et al.* [63], al trasplantar neuronas dopaminérgicas inmaduras derivadas de hESC y tejido hfVM en la SNpc o en el núcleo estriado, reportaron que después de 5 meses las células lograban obtener un fenotipo dopaminérgico maduro mesencefálico (TH<sup>+</sup>/GIRK2<sup>+</sup>), con datos similares entre ambos sitios anatómicos, inclusive el injerto en la SNpc alcanzaba a inervar sitios específicos como el núcleo caudado y putamen, que contrario a nuestros resultados, presentaba mejoría en el comportamiento motor, aunque no indicaron el porcentaje de células del trasplante que fueron TH<sup>+</sup>. A la par, Rath *et al.* [163], trasplantaron tejido hfVM, en la SNpc con una sobrevivencia celular de hasta 5.5% a las 15 semanas post-trasplante (spt), sin que se logren identificar proyecciones provenientes del trasplante, aunado a que no se alcanzó una mejoría en el comportamiento motor.

En este sentido existen varios factores a considerar, el primero es el estado de la SNpc, ya que como se comentó en párrafos anteriores la SNpc adulta intacta no es permisiva para la diferenciación dopaminérgica [120]. Sin embargo, cuando células de CE derivadas de ESC de ratón son trasplantadas en la SNpc lesionada con 6-OHDA logran expresar de manera transitoria el marcador TH al finalizar la primera semana, pero a los 15 dpt esta expresión no se observa, por lo que la SNpc lesionadas podría tener la permisividad para la especificación pero no para el mantenimiento del fenotipo dopaminérgico [146]. Interesantemente, cuando células de PP derivadas de hiPSC son trasplantadas en el mesencéfalo ventral de embriones de ratón en el día embrionario E11.5 logran expresar TH tan pronto como el día embrionario E18.5 y, en el día diez posnatal alcanzan a inervar el núcleo estriado [106].

Estos resultados ilustran las diferentes señales que pueden estar presentes según el estado de la SNpc (Intacta, lesionada o en desarrollo) y que en última instancia tienen implicaciones sobre su función como nicho que permita la diferenciación dopaminérgica.

El segundo factor es la fuente celular del trasplante. Con el uso células de CE derivadas de hESC que sobreexpresan los FT LFO se observan rosetas neurales a los 7 y 15 dpt, además de neuromelanina (característico de neuronas catecolaminérgicas [168]) y expresión de TH a los 30 dpt, resultados que indican el desarrollo del fenotipo dopaminérgico por parte de las células trasplantadas (Ramos-Acevedo, en escritura). En contraste, empleando células de CE derivadas de hiPSC con los mismos FT LFO no se observó sobrevivencia a los 7, 15 y 30 dpt (Ramos-Acevedo *et al.* en escritura), lo que podría estar relacionado con las diferencias en los patrones de expresión de genes entre ESC e iPSC que se han reportado [59, 169].

El tercer factor es el estadio de diferenciación dopaminérgica y el protocolo usado para dicha diferenciación [63, 67, 106, 146, 163, 170]. Incluso, la administración de inmunosupresión se tendría que tomar en cuenta, pues la exposición prolongada a ciclosporina se ha asociado a disminución del número de células TH<sup>+</sup> en los trasplantes realizados en el núcleo estriado [63].

En lo que concierne a las células que trasplantamos en el quinto día de la fase de maduración, el porcentaje de sobrevivencia fue menor al encontrado empleando células de PP, observaciones que van en concordancia con lo reportado por Brederlau *et al.* quienes describieron que el número de células en los trasplantes disminuía en relación al número de días que las células se diferenciaban *in vitro* [171].

Aún más, el porcentaje de encéfalos SC121<sup>+</sup> de la línea 3X SNCA a 15 dpt fue de 30%, en tanto que a 2 mpt ningún encéfalo fue SC121<sup>+</sup> (0 de 10 ratas). De hecho, tampoco se observa sobrevivencia cuando células de CE derivadas de hESC con 3X SNCA son trasplantadas en la SNpc (Ramos-Acevedo *et al.* en escritura).

Como ya se ha comentado a lo largo del texto, la patología causada por la  $\alpha$ -sinucleína encuentra parte de su origen en el estrés oxidativo [32]. Asimismo, existe evidencia que vincula la poca sobrevivencia celular de los trasplantes con la inflamación y el estrés oxidativo que están presentes en los sitios de lesión [172]. Por lo que no podemos descartar que las condiciones desfavorables del microambiente (estrés oxidativo, inflamación e hipoxia), causadas incluso por el mismo procedimiento del trasplante [163], estén sinergizando *in vivo* los eventos negativos de la  $\alpha$ -sinucleína (ej. disfunción de la CTE y aumento de la permeabilidad mitocondrial) que conducen a la muerte celular en una línea ya de por sí vulnerable por la triplicación del gen SNCA, donde más del 68% de las células TH<sup>+</sup> expresan también  $\alpha$ -sinucleína (**Tabla anexa 2**) [15, 31, 32]. Otro punto para considerar es la observación de cavitaciones producidas por la neurodegeneración relacionada a la lesión con 6-OHDA que pudiera comprometer la sobrevivencia a largo plazo de las células trasplantadas [146].

En relación con la implicación de la ausencia de la  $\alpha$ -sinucleína *in vivo* los datos son divergentes, por un lado Abeliovich *et al.* describieron que el ratón *knockout* para el gen SNCA no tiene alteraciones en la citoarquitectura del encéfalo, ni en el número de células TH<sup>+</sup> en la SNpc, de hecho, liberan y captan dopamina de manera normal ante estímulos eléctricos simples. Sin embargo, tienen un patrón alterado en su liberación ante estímulos eléctricos en pares y presentan disminución de la concentración de dopamina estriatal [173]. Por otro lado, Garcia-Reitboeck *et al.* reportaron que dos cepas de ratones *knockout* para el gen SNCA (incluyendo la usada por Abeliovich *et al.* [173]) tenían un menor número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en comparación al control a partir del día embrionario E13.5 [174]. Resultados similares fueron reportados por Robertson *et al.* [175], pero sin cambios significativos en los niveles de dopamina estriatal o disfunción motora. Estas variaciones, a decir de dichos autores, podrían estar explicadas sobre todo por cuestiones metodológicas, incluyendo la cruce de los animales [175]. Lo que implica que es necesaria una mayor investigación para esclarecer el papel de la  $\alpha$ -sinucleína sobre el desarrollo dopaminérgico *in vivo*.

Debido a que a 2 mpt tanto las células de PP y del quinto día de la fase de maduración dopaminérgica mostraban la señal de TH principalmente en las prolongaciones neuronales, decidimos emplear el coeficiente de correlación de Pearson. Encontramos una baja correlación en la colocalización de las señales de TH y SC121, lo que se podría representar que los trasplantes celulares en la SNpc no lograron desarrollar un fenotipo dopaminérgico. En este sentido, dicha colocalización podría ser el resultado de la sobrevivencia de las células que en cultivo ya tenían expresión de TH (**Tablas anexas 1 y 2**), ante este contexto estamos llevando a cabo la cuantificación de células TH<sup>+</sup> en los trasplantes para su comparación con los resultados *in vitro*.

Resalta el hecho de que en los campos de los trasplantes hayamos encontrado una expresión sustancial de TH (**Figuras 26, 27 y 28**) que como se comentó en el párrafo anterior no colocalizó con el marcador SC121 y, dado que previo al trasplante en los grupos lesionados con 6-OHDA la pérdida de las neuronas dopaminérgicas endógenas de la SNpc es mayor al 90%, la presencia de dicha señal sugiere que las células trasplantadas pudieran estar atrayendo fibras TH<sup>+</sup> de zonas dopaminérgicas adyacentes del mesencéfalo, como la formación reticular ascendente o el área tegmental ventral.

En este orden de ideas se ha demostrado que células de PP secretan Netrina-1 a la matriz extracelular [176, 177], la cual es una proteína quimioatrayente implicada en la guía y dirección de los axones en el sistema nervioso central [178], entre los que se encuentran axones dopaminérgicos [179] de la SNpc y el núcleo estriado [180]. Ante este hecho, sería adecuado realizar inmunofluorescencias para Netrina-1 en el trasplante celular, con la intención de identificar la contribución, si es que existe, al resultado observado.

Es importante mencionar que a 2 mpt los trasplantes de la línea celular Control en el quinto día de la fase de maduración tenían dimensiones superiores a los encontrados en las otras dos líneas celulares, lo cual probablemente se debe a que se trasplantó un mayor número de células o que

dentro del cultivo utilizado se encontraban células proliferativas [158], que podrían ser remanentes de hiPSC indiferenciadas, pero también cabe la posibilidad de que sean células progenitoras de estirpe neuronal, puesto que el trasplante en su mayoría era  $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>. Sin embargo, para poder discernir lo ocurrido, sería necesario realizar inmunofluorescencias contra marcadores específicos de proliferación celular (ej. Ki67) e identificar marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2, KLF4).

En la literatura hay descripciones relacionadas; Brederlau *et al.* [171] trasplantaron en el núcleo estriado células dopaminérgicas derivadas de hESC que habían estado en cocultivo con células PAX6<sup>+</sup> por 16, 20 y 23 días, en todos los trasplantes del primer tiempo y en parte del segundo se encontraron teratomas; ahora bien, una pequeña fracción celular resultó TH<sup>+</sup> después de 13 spt.

Un método oportuno para evitar trasplantar células con potencial tumorigénico fue descrito por Doi *et al.* [170], mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para los marcadores CORIN<sup>+</sup>/FoxA2<sup>+</sup>/Lmx1 $\alpha$ <sup>+</sup>, lograron aislar precursores dopaminérgicos derivados de hiPSC, los cuales al ser trasplantadas en el núcleo estriado de ratas, se diferenciaban en neuronas dopaminérgicas, dando como resultado una mejora significativa del comportamiento motor sin la formación de tumores.

### 10.3 Trasplantes celulares en el núcleo estriado

Históricamente, el núcleo estriado ha sido la localización elegida para albergar en la mayoría de casos los trasplantes celulares, debido a que es el sitio de liberación de la dopamina proveniente de la vía nigroestriatal y permite la sobrevivencia con una adecuada integración y funcionalidad de las células trasplantadas [63, 163, 181]. Adicional a lo discutido en párrafos anteriores, existe evidencia de que células trasplantadas en estadios inmaduros son capaces de desarrollar un fenotipo dopaminérgico maduro [65-67, 170], por consiguiente se le podría considerar un nicho permisivo para el desarrollo dopaminérgico.

También en el núcleo estriado existen resultados heterogéneos, por un lado, células de CE derivadas de ESC de ratón trasplantadas en el núcleo estriado intacto de rata se derivan hacia astrocitos en lugar de adquirir un fenotipo neuronal [120]. De forma similar, Li *et al.* trasplantaron células primitivas neuroepiteliales (MAP2<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>) en diferentes áreas del encéfalo (incluyendo el núcleo estriado) de ratón con SCID (inmunodeficiencia combinada grave) y tampoco detectaron una diferenciación a neuronas TH<sup>+</sup>, pero tampoco presencia de neoplasias[166].

A su vez, Qiu *et al.* trasplantaron progenitores dopaminérgicos en el núcleo estriado de ratones (FoxA2<sup>+</sup>/Lmx1 $\alpha$ <sup>+</sup>) y a los 3 mpt identificaron que la mayoría de las células eran  $\beta$ -III-TUB<sup>+</sup> pero el porcentaje de neuronas TH<sup>+</sup> era de apenas 3.73%. [65].

En contraste, Kirkeby *et al.* [67] describieron que la expresión de marcadores (FoxA2<sup>+</sup>, Lmx1 $\alpha$ <sup>+</sup>/NURR1<sup>+</sup>) en neuronas dopaminérgicas inmaduras trasplantadas en el núcleo estriado, no se correlacionaban con desenlaces tales como porcentaje de TH, densidad de TH o volumen del

trasplante; aunque si encontraron otros marcadores (mRNA) ventrales mesencefálicos caudales (ejemplo, EN1, PAX8, ETV5, y SPRY1) que si correlacionaban con una alta maduración dopaminérgica *in vivo* (3.716 TH<sup>+</sup> por cada 100,000 células trasplantadas) y con recuperación del comportamiento motor. Por lo tanto, aunque existe evidencia que demuestra las bondades del núcleo estriado para albergar trasplantes celulares, todavía falta más investigación para considerar esta práctica en un contexto traslacional.

#### **10.4 Número de células y tiempo del trasplante como determinantes a considerar para la maduración dopaminérgica *in vivo***

Si se convierte el número de células TH<sup>+</sup> a porcentaje de células TH<sup>+</sup> de Kirkeby *et al.* [67] y se compara con el reportado por Qiu *et al.* [65] se obtendrá un número muy similar (~3.71% contra 3.73%) con la diferencia de que en el segundo no se logró recuperación del comportamiento motor. Tales discrepancias entre estos resultados y los reportados por nosotros podrían explicarse en parte, por el tiempo que permanece el trasplante en el sitio anatómico, ya que con Kirkeby *et al.* [67] es de 6 meses en el núcleo estriado, con Qiu *et al.* [65] de 3 meses en el núcleo estriado y con nosotros de 2 meses en la SNpc, siendo que el primero observó dicha mejoría hasta el quinto mpt; tiempo cercano a los 6 mpt, donde empezó a aumentar significativamente la capacidad de almacenamiento de dopamina estriatal que se asoció a mejoría clínica en pacientes con EP con injertos de tejido hfVM [113]. Por tal motivo, sería oportuno de nuestra parte que el trasplante permaneciera más allá de 2 meses en el encéfalo de las ratas.

Una observación pertinente que pudiera tener implicaciones sobre el tiempo que debe de permanecer el trasplante se centra en que el encéfalo de ratón tiene ~10,000 [182-184] y el de rata ~15,000 [185-187] neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en la SNpc, cifra muy por debajo del rango de células que se trasplantan (50,000-400,000) [63, 66, 67, 156, 170].

En consecuencia, la fracción de células que puede estar en contacto con el microambiente del encéfalo receptor es baja [188], dejando un remanente celular inmaduro significativo que no se ve influenciado por el entorno, y que pudiera explicar en cierta medida, el bajo porcentaje de células TH<sup>+</sup> obtenidas *in vivo* frente a los protocolos *in vitro*, lo que podría llegar a crear sesgos en la interpretación de resultados sobre las verdaderas propiedades de los posibles nichos de diferenciación dopaminérgica en el encéfalo adulto. Una aproximación de lo anterior lo ejemplifica Björklund *et al.* que al trasplantar ESC de ratón en estado pluripotente a bajas concentraciones (1000-2000 células/ $\mu$ l) en el núcleo estriado observaron mejoría del comportamiento motor tan pronto como 9 spt [188], tiempo que contrasta con los 6 mpt que debe de permanecer el trasplante a concentraciones más altas [63, 66, 67, 156, 170].

A pesar de esto, en un contexto traslacional un bajo número de células TH<sup>+</sup> pudiera ser suficiente, puesto que en ratas el umbral para tener mejoría significativa en el comportamiento motor se encuentra entre 500-1200 neuronas TH<sup>+</sup> ya sea usando neuronas derivadas de ESC, hiPSC o tejido hfVM [63, 163, 181].

Estos resultados en conjunto demuestran que, empleando las metodologías actuales, el porcentaje de células TH<sup>+</sup> a ser desarrollado por células trasplantadas en la SNpc o en el núcleo estriado es bajo. Por lo tanto, se requieren de mayores estudios para conocer las complejas señales y moléculas, incluyendo proteínas como la  $\alpha$ -sinucleína, que se necesitan para alcanzar un fenotipo dopaminérgico mesencefálico maduro *in vivo*, así como, para la correcta inervación de estructuras diana.

## 11. Conclusiones

1. Las líneas celulares 3X SNCA, Control y SNCA KO son capaces de desarrollar un fenotipo dopaminérgico mesencefálico *in vitro*.
2. La SNpc lesionada con 6-OHDA o en un control con SS es un nicho permisivo para la sobrevivencia neuronal de las líneas celulares 3X SNCA, Control y SNCA KO a 15 dpt y 2 mpt, cuando son implantadas en etapa de PP.
3. La SNpc lesionada o control es permisiva para la sobrevivencia neuronal de las líneas celulares Control y SNCA KO a 15 dpt y 2 mpt cuando son implantadas en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica, aunque su sobrevivencia es en menor porcentaje en comparación a las células de PP.
4. La ausencia de  $\alpha$ -sinucleína mediada por el *knockout* isogénico, no tiene efectos negativos sobre la sobrevivencia a 15 dpt y 2 mpt de al trasplantarse como células de PP o del quinto día de la fase de maduración dopaminérgica.
5. Por el contrario, la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína tiene un efecto negativo en la sobrevivencia de las células trasplantadas en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica. Mientras que en cultivo pareciera no afectar el desarrollo de ese linaje en ninguna de las etapas estudiadas.
6. El trasplante celular en la SNpc no mejora el comportamiento motor, debido probablemente a la falta de desarrollo del fenotipo dopaminérgico.

## 12. Perspectivas

1. Cuantificar las células TH<sup>+</sup> observadas 2 mpt.
2. El trasplante de células de la línea SNCA KO puede servir como modelo de estudio de la transmisión de la  $\alpha$ -sinucleína *in vivo*.

## 13. Referencias

1. James Parkinson, *An Essay on the Shaking Palsy*. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences, 2002. **14**(2): p. 223-236.
2. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-376.
3. Lebouvier, T., et al., *The second brain and Parkinson's disease*. European Journal of Neuroscience, 2009. **30**(5): p. 735-741.
4. Pringsheim, T., et al., *The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis*. Movement Disorders, 2014. **29**(13): p. 1583-1590.
5. Dorsey, E.R., et al., *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. Neurology, 2007. **68**(5): p. 384-386.
6. Cruz Alcalá, L.E. and J.L. Vázquez Castellanos, *Prevalencia de algunas enfermedades neurológicas en la Ciudad de Tepatitlán, Jalisco, México*. Revista Mexicana de Neurociencia, 2002. **3**(2): p. 71-76.
7. Poewe, W., et al., *Parkinson disease*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**: p. 1-21.
8. Kalia, L.V. and A.E. Lang, *Parkinson's disease*. The Lancet, 2015. **386**(9996): p. 896-912.
9. Benazzouz, A., et al., *Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2014. **6**(87).
10. Porritt, M., et al., *Dopaminergic innervation of the human striatum in Parkinson's disease*. Movement Disorders, 2005. **20**(7): p. 810-818.
11. Gesi, M., et al., *The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2000. **24**(6): p. 655-668.
12. Lee, D.J., et al., *Nucleus basalis of Meynert neuronal activity in Parkinson's disease*. 2019. **132**(2): p. 574.
13. Pahapill, P.A. and A.M. Lozano, *The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease*. Brain, 2000. **123**(9): p. 1767-1783.
14. Qamhawi, Z., et al., *Clinical correlates of raphe serotonergic dysfunction in early Parkinson's disease*. Brain, 2015. **138**(10): p. 2964-2973.
15. Dickson, D.W., *Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(8).
16. Hornykiewicz, O., *Basic Research on Dopamine in Parkinson's Disease and the Discovery of the Nigrostriatal Dopamine Pathway: The View of an Eyewitness*. Neurodegenerative Diseases, 2008. **5**(3-4): p. 114-117.
17. Hornykiewicz, O., *The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain*, in *Parkinson's Disease and Related Disorders*, P. Riederer, et al., Editors. 2006, Springer Vienna: Vienna. p. 9-15.
18. Pakkenberg, B., et al., *The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1991. **54**(1): p. 30-33.
19. Fearnley, J.M. and A.J. Lees, *AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY*. Brain, 1991. **114**(5): p. 2283-2301.
20. Guttman, M., S.J. Kish, and Y. Furukawa, *Current concepts in the diagnosis and management of Parkinson's disease*. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne, 2003. **168**(3): p. 293-301.
21. Bendor, Jacob T., Todd P. Logan, and Robert H. Edwards, *The Function of  $\alpha$ -Synuclein*. Neuron, 2013. **79**(6): p. 1044-1066.

22. Lautenschläger, J., et al., *C-terminal calcium binding of  $\alpha$ -synuclein modulates synaptic vesicle interaction*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 712.
23. Oueslati, A., M. Fournier, and H.A. Lashuel, *Chapter 7 - Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of  $\alpha$ -synuclein: Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies*, in *Progress in Brain Research*, A. Björklund and M.A. Cenci, Editors. 2010, Elsevier. p. 115-145.
24. Whittaker, H.T., et al., *Multiple system atrophy: genetic risks and alpha-synuclein mutations*. F1000Research, 2017. **6**: p. 2072-2072.
25. Bisaglia, M., et al., *Structure and topology of the non-amyloid-beta component fragment of human alpha-synuclein bound to micelles: implications for the aggregation process*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2006. **15**(6): p. 1408-1416.
26. Bussell, R. and D. Eliezer, *A Structural and Functional Role for 11-mer Repeats in  $\alpha$ -Synuclein and Other Exchangeable Lipid Binding Proteins*. Journal of Molecular Biology, 2003. **329**(4): p. 763-778.
27. Martial, B., et al., *Vibrational Circular Dichroism Reveals Supramolecular Chirality Inversion of  $\alpha$ -Synuclein Peptide Assemblies upon Interactions with Anionic Membranes*. ACS Nano, 2019. **13**(3): p. 3232-3242.
28. Lavedan, C., *The Synuclein Family*. Genome Research, 1998. **8**(9): p. 871-880.
29. Taguchi, K., et al., *Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein*. Journal of Comparative Neurology, 2016. **524**(6): p. 1236-1258.
30. Koprach, J.B., L.V. Kalia, and J.M. Brotchie, *Animal models of [alpha]-synucleinopathy for Parkinson disease drug development*. Nature Reviews Neuroscience, 2017. **18**(9): p. 515-529.
31. Lashuel, H.A., et al., *The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target*. Nature reviews. Neuroscience, 2013. **14**(1): p. 38-48.
32. Bernal-Conde, L.D., et al., *Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles*. Frontiers in Neuroscience, 2020. **13**(1399).
33. Spillantini, M.G., et al.,  *$\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-840.
34. Wakabayashi, K., et al., *The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of  $\alpha$  - synuclein aggregates*. Neuropathology, 2007. **27**(5): p. 494-506.
35. Singleton, A.B., et al.,  *$\alpha$ -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 841-841.
36. Piper, D.A., D. Sastre, and B. Schüle, *Advancing Stem Cell Models of Alpha-Synuclein Gene Regulation in Neurodegenerative Disease*. Frontiers in neuroscience, 2018. **12**: p. 199-199.
37. Zafar, F., et al., *Genetic fine-mapping of the lowan SNCA gene triplication in a patient with Parkinson's disease*. npj Parkinson's Disease, 2018. **4**(1): p. 18.
38. Byers, B., et al., *SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate  $\alpha$ -synuclein and are susceptible to oxidative stress*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e26159-e26159.
39. Oliveira, L.M.A., et al., *Elevated  $\alpha$ -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells*. Cell death & disease, 2015. **6**(11): p. e1994-e1994.
40. Flierl, A., et al., *Higher Vulnerability and Stress Sensitivity of Neuronal Precursor Cells Carrying an Alpha-Synuclein Gene Triplication*. PLOS ONE, 2014. **9**(11): p. e112413.
41. Zafar, F., et al., *CRISPR knock-out of alpha-synuclein in patient-derived pluripotent stem cell model of Parkinson's disease*. 2017: Presented at 15th International Society for Stem Cell Research Meeting 2017.



42. Rostovtseva, T.K., et al.,  *$\alpha$ -Synuclein Shows High Affinity Interaction with Voltage-dependent Anion Channel, Suggesting Mechanisms of Mitochondrial Regulation and Toxicity in Parkinson Disease*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(30): p. 18467-18477.
43. Emma Deas, N.C., Plamena R. Angelova, Marthe H.R. Ludtmann, Zhi Yao, Serene Chen, Mathew H. Horrocks, Blerida Banushi, Daniel Little, Michael J. Devine, Paul Gissen, David Klenerman, Christopher M. Dobson, Nicholas W. Wood, Sonia Gandhi, and Andrey Y. Abramov., *Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease*. Antioxidants & Redox Signaling, 2016. **24**(7): p. 376-391.
44. Luth, E.S., et al., *Soluble, Prefibrillar  $\alpha$ -Synuclein Oligomers Promote Complex I-dependent, Ca<sup>2+</sup>-induced Mitochondrial Dysfunction*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(31): p. 21490-21507.
45. Hashimoto, M., et al., *Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/[alpha]-synuclein in vitro*. Neuroreport, 1999. **10**(4): p. 717-721.
46. Souza, J.M., et al., *Dityrosine Cross-linking Promotes Formation of Stable  $\alpha$ -Synuclein Polymers: IMPLICATION OF NITRATIVE AND OXIDATIVE STRESS IN THE PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE SYNUCLEINOPATHIES*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(24): p. 18344-18349.
47. Devi, L., et al., *Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(14): p. 9089-9100.
48. Singh, N., V. Pillay, and Y.E. Choonara, *Advances in the treatment of Parkinson's disease*. Progress in Neurobiology, 2007. **81**(1): p. 29-44.
49. Rajput, A.H., et al., *Timely levodopa (LD) administration prolongs survival in Parkinson's disease*. Parkinsonism & Related Disorders, 1997. **3**(3): p. 159-165.
50. Ellis, J.M. and M.J. Fell, *Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017. **27**(18): p. 4247-4255.
51. Macleod, A.D., K.S.M. Taylor, and C.E. Counsell, *Mortality in Parkinson's disease: A systematic review and meta - analysis*. Movement Disorders, 2014. **29**(13): p. 1615-1622.
52. Williams-Gray, C.H., et al., *The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2013. **84**(11): p. 1258-1264.
53. de Lau, L.L., et al., *Prognosis of parkinson disease: Risk of dementia and mortality: the rotterdam study*. Archives of Neurology, 2005. **62**(8): p. 1265-1269.
54. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology*. Cell, 1997. **88**(3): p. 287-298.
55. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. **441**: p. 1068.
56. Alison, M.R., et al., *An introduction to stem cells*. The Journal of Pathology, 2002. **197**(4): p. 419-423.
57. Wu, J. and J.C. Izpisua Belmonte, *Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research*. Cell. **165**(7): p. 1572-1585.
58. Takahashi, K., et al., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-872.
59. Chin, M.H., et al., *Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(1): p. 111-123.

60. Martin, G.R., *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, 1981. **78**(12): p. 7634-7638.
61. Thomson, J.A., et al., *Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.
62. Nichols, J. and A. Smith, *Naive and Primed Pluripotent States*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 487-492.
63. Grealish, S., et al., *Human ESC-Derived Dopamine Neurons Show Similar Preclinical Efficacy and Potency to Fetal Neurons when Grafted in a Rat Model of Parkinson's Disease*. Cell Stem Cell, 2014. **15**(5): p. 653-665.
64. Arenas, E., M. Denham, and J.C. Villaescusa, *How to make a midbrain dopaminergic neuron*. Development, 2015. **142**(11): p. 1918-1936.
65. Qiu, L., et al., *Immature Midbrain Dopaminergic Neurons Derived from Floor - Plate Method Improve Cell Transplantation Therapy Efficacy for Parkinson's Disease*. Stem Cells Translational Medicine, 2017. **6**(9): p. 1803-1814.
66. Kirkeby, A., et al., *Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions*. Cell Reports, 2012. **1**(6): p. 703-714.
67. Kirkeby, A., et al., *Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease*. Cell stem cell, 2017. **20**(1): p. 135-148.
68. Landry, D.W. and H.A. Zucker, *Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(9): p. 1184-1186.
69. Hipp, J. and A. Atala, *Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine*. Stem Cell Reviews, 2008. **4**(1): p. 3-11.
70. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-676.
71. Yu, J., et al., *Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1920.
72. Wassarman, K.M., et al., *Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function*. Development, 1997. **124**(15): p. 2923-2934.
73. Zetterström, R.H., et al., *Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system*. Molecular Brain Research, 1996. **41**(1): p. 111-120.
74. Nelander, J., J.B. Hebsgaard, and M. Parmar, *Organization of the human embryonic ventral mesencephalon*. Gene Expression Patterns, 2009. **9**(8): p. 555-561.
75. Freeman, T.B., et al., *Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra*. Experimental Neurology, 1991. **113**(3): p. 344-353.
76. Placzek, M. and J. Briscoe, *The floor plate: multiple cells, multiple signals*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(3): p. 230-240.
77. Broccoli, V., E. Boncinelli, and W. Wurst, *The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 164-168.
78. Millet, S., et al., *A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 161-164.
79. Puellas, E., et al., *Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain*. Development, 2004. **131**(9): p. 2037-2048.
80. Ye, W., et al., *FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate*. Cell, 1998. **93**(5): p. 755-766.

81. Sasaki, H., et al., *A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro*. *Development*, 1997. **124**(7): p. 1313-1322.
82. Briscoe, J. and J. Ericson, *The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1999. **10**(3): p. 353-362.
83. Marti, E., et al., *Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants*. *Nature*, 1995. **375**(6529): p. 322-325.
84. Smidt, M.P., et al., *A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b*. *Nature Neuroscience*, 2000. **3**(4): p. 337-341.
85. Andersson, E., et al., *Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 393-405.
86. Chung, S., et al., *Wnt1-lmx1a Forms a Novel Autoregulatory Loop and Controls Midbrain Dopaminergic Differentiation Synergistically with the SHH-FoxA2 Pathway*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(6): p. 646-658.
87. Zetterström, R.H., et al., *Dopamine Neuron Agenesis in Nurr1-Deficient Mice*. *Science*, 1997. **276**(5310): p. 248-250.
88. Maxwell, S.L., et al., *Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development*. *Developmental Biology*, 2005. **282**(2): p. 467-479.
89. Saucedo-Cardenas, O., et al., *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*, 1998. **95**(7): p. 4013-4018.
90. Le, W.-d., et al., *Selective Agenesis of Mesencephalic Dopaminergic Neurons in Nurr1-Deficient Mice*. *Experimental Neurology*, 1999. **159**(2): p. 451-458.
91. Hwang, D.-Y., et al., *Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice*. *Molecular Brain Research*, 2003. **114**(2): p. 123-131.
92. van den Munckhof, P., et al., *Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons*. *Development*, 2003. **130**(11): p. 2535-2542.
93. Jankovic, J., S. Chen, and W.D. Le, *The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease*. *Progress in Neurobiology*, 2005. **77**(1): p. 128-138.
94. Kadkhodaei, B., et al., *Nurr1 Is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons*. *The Journal of Neuroscience*, 2009. **29**(50): p. 15923-15932.
95. Smits, S.M., et al., *Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons*. *European Journal of Neuroscience*, 2003. **18**(7): p. 1731-1738.
96. Oh, Y., *Patient-specific pluripotent stem cell-based Parkinson's disease models showing endogenous alpha-synuclein aggregation*. *BMB reports*, 2019. **52**.
97. Perrier, A.L., et al., *Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(34): p. 12543-12548.
98. Koch, P., et al., *A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(9): p. 3225-3230.
99. Itskovitz-Eldor, J., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers*. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 2000. **6**(2): p. 88-95.
100. Swistowski, A., et al., *Xeno-free defined conditions for culture of human embryonic stem cells, neural stem cells and dopaminergic neurons derived from them*. *PloS one*, 2009. **4**(7): p. e6233-e6233.

101. Cho, M.S., et al., *Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(9): p. 3392-3397.
102. Roy, N.S., et al., *Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes*. Nature Medicine, 2006. **12**(11): p. 1259-68.
103. Theka, I., et al., *Rapid generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells through a single-step procedure using cell lineage transcription factors*. Stem cells translational medicine, 2013. **2**(6): p. 473-479.
104. Kumar, M., et al., *Neurospheres Derived from Human Embryoid Bodies Treated with Retinoic Acid Show an Increase in Nestin and Ngn2 Expression That Correlates with the Proportion of Tyrosine Hydroxylase-Positive Cells*. Stem Cells and Development, 2007. **16**(4): p. 667-682.
105. Ross, S. and C.S. Hill, *How the Smads regulate transcription*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008. **40**(3): p. 383-408.
106. Fedele, S., et al., *Expansion of human midbrain floor plate progenitors from induced pluripotent stem cells increases dopaminergic neuron differentiation potential*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 6036.
107. Zhang, X.-Q. and S.-C. Zhang, *Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2010. **584**: p. 355-366.
108. Fathi, A., et al., *Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Embryonic Stem Cells during Differentiation into Neural Cells*. PLOS ONE, 2011. **6**(7): p. e22856.
109. Barker, R.A., J. Drouin-Ouellet, and M. Parmar, *Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential*. Nature Reviews Neurology, 2015. **11**: p. 492.
110. Lindvall, O., et al., *Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson's Disease: A Detailed Account of Methodology and a 6-Month Follow-up*. Archives of Neurology, 1989. **46**(6): p. 615-631.
111. Lindvall, O., et al., *Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease*. Science, 1990. **247**(4942): p. 574-577.
112. Widner, H., et al., *Bilateral Fetal Mesencephalic Grafting in Two Patients with Parkinsonism Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-L,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP)*. New England Journal of Medicine, 1992. **327**(22): p. 1556-1563.
113. Piccini, P., et al., *Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts*. Annals of Neurology, 2000. **48**(5): p. 689-695.
114. Hauser, R.A., et al., *Long-term Evaluation of Bilateral Fetal Nigral Transplantation in Parkinson Disease*. Archives of Neurology, 1999. **56**(2): p. 179-187.
115. Olanow, C.W., et al., *A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease*. Annals of Neurology, 2003. **54**(3): p. 403-414.
116. Freed, C.R., et al., *Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(10): p. 710-719.
117. Kikuchi, T., et al., *Human iPSC cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model*. Nature, 2017. **548**: p. 592.
118. Hallett, Penelope J., et al., *Successful Function of Autologous iPSC-Derived Dopamine Neurons following Transplantation in a Non-Human Primate Model of Parkinson's Disease*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(3): p. 269-274.
119. Barker, R.A., et al., *Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era*. Cell Stem Cell, 2017. **21**(5): p. 569-573.
120. Maya-Espinosa, G., et al., *Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Cells Reveal Niches that Support Neuronal Differentiation in the Adult Rat Brain*. STEM CELLS, 2015. **33**(2): p. 491-502.

121. Mendez, I., et al., *Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease*. *Brain : a journal of neurology*, 2005. **128**(Pt 7): p. 1498-1510.
122. Byrne, J.A., H.N. Nguyen, and R.A. Reijo Pera, *Enhanced generation of induced pluripotent stem cells from a subpopulation of human fibroblasts*. *PloS one*, 2009. **4**(9): p. e7118-e7118.
123. Devine, M.J., et al., *Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the  $\alpha$ -synuclein locus*. *Nature communications*, 2011. **2**: p. 440-440.
124. Mittal, S., et al.,  *$\beta$ 2-Adrenoreceptor is a regulator of the  $\alpha$ -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease*. *Science (New York, N.Y.)*, 2017. **357**(6354): p. 891-898.
125. Reyes, J.F., et al., *A cell culture model for monitoring  $\alpha$ -synuclein cell-to-cell transfer*. *Neurobiology of Disease*, 2015. **77**: p. 266-275.
126. Zafar, F., et al., *High-efficiency differentiation into functional dopaminergic neurons from Parkinson's patients-derived induced pluripotent stem cells (Poster)*, in *F1000Research 2016*, **5**:1555 (poster) 2016.
127. Volakakis, N., et al., *Nurr1 and Retinoid X Receptor Ligands Stimulate Ret Signaling in Dopamine Neurons and Can Alleviate  $\alpha$ -Synuclein Disrupted Gene Expression*. *J Neurosci*, 2015. **35**(42): p. 14370-85.
128. Decressac, M., et al.,  *$\alpha$ -Synuclein-Induced Down-Regulation of Nurr1 Disrupts GDNF Signaling in Nigral Dopamine Neurons*. *Science Translational Medicine*, 2012. **4**(163): p. 163ra156-163ra156.
129. Tarasova, T.V., et al., *Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain*. *PeerJ*, 2018. **6**: p. e4779-e4779.
130. *PSC Dopaminergic Neuron Differentiation Kit*. 2016, Thermo Fisher Scientific. p. 1-31.
131. Blandini, F. and M.-T. Armentero, *Animal models of Parkinson's disease*. *The FEBS Journal*, 2012. **279**(7): p. 1156-1166.
132. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 1998, Academic Press: San Diego, CA.
133. Bové, J. and C. Perier, *Neurotoxin-based models of Parkinson's disease*. *Neuroscience*, 2012. **211**(Supplement C): p. 51-76.
134. Hudson, J.L., et al., *Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats*. *Brain Research*, 1993. **626**(1): p. 167-174.
135. Schober, P., C. Boer, and L.A. Schwarte, *Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation*. *Anesthesia & Analgesia*, 2018. **126**(5): p. 1763-1768.
136. Manders, E.M., et al., *Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy*. *Journal of Cell Science*, 1992. **103**(3): p. 857-862.
137. Adler, J. and I. Parmryd, *Quantifying colocalization by correlation: The Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient*. *Cytometry Part A*, 2010. **77A**(8): p. 733-742.
138. MCDONALD, J.H. and K.W. DUNN, *Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy*. *Journal of Microscopy*, 2013. **252**(3): p. 295-302.
139. Stauffer, W., H. Sheng, and H.N. Lim, *EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 15764.
140. Caccamo, D.V., et al., *An immunohistochemical study of neuropeptides and neuronal cytoskeletal proteins in the neuroepithelial component of a spontaneous murine ovarian teratoma*. *Primitive*

- neuroepithelium displays immunoreactivity for neuropeptides and neuron-associated beta-tubulin isotype*. The American journal of pathology, 1989. **135**(5): p. 801-813.
141. Zhang, J. and J. Jiao, *Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis*. BioMed research international, 2015. **2015**.
142. Horesh, D., et al., *Doublecortin, a Stabilizer of Microtubules*. Human Molecular Genetics, 1999. **8**(9): p. 1599-1610.
143. Zhu, F., et al., *DICE, an efficient system for iterative genomic editing in human pluripotent stem cells*. Nucleic acids research, 2014. **42**(5): p. e34-e34.
144. Mahajani, S., et al., *Homogenous generation of dopaminergic neurons from multiple hiPSC lines by transient expression of transcription factors*. Cell Death & Disease, 2019. **10**(12): p. 898.
145. Friling, S., et al., *Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(18): p. 7613-7618.
146. Collazo-Navarrete, O., et al., *The Substantia Nigra Is Permissive and Gains Inductive Signals When Lesioned for Dopaminergic Differentiation of Embryonic Stem Cells*. Stem Cells and Development, 2019. **28**(16): p. 1104-1115.
147. Xia, N., et al., *A Knockin Reporter Allows Purification and Characterization of mDA Neurons from Heterogeneous Populations*. Cell Reports, 2017. **18**(10): p. 2533-2546.
148. Rosenblad, C., B. Georgievska, and D. Kirik, *Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system*. European Journal of Neuroscience, 2003. **17**(2): p. 260-270.
149. Georgievska, B., D. Kirik, and A. Björklund, *Overexpression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Using a Lentiviral Vector Induces Time- and Dose-Dependent Downregulation of Tyrosine Hydroxylase in the Intact Nigrostriatal Dopamine System*. The Journal of Neuroscience, 2004. **24**(29): p. 6437-6445.
150. Chinta, S.J., et al., *Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo*. Neuroscience Letters, 2010. **486**(3): p. 235-239.
151. Peng, X.M., et al.,  *$\alpha$ -Synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(15): p. 3523-3530.
152. Alerte, T.N.M., et al., *Alpha-synuclein aggregation alters tyrosine hydroxylase phosphorylation and immunoreactivity: lessons from viral transduction of knockout mice*. Neuroscience letters, 2008. **435**(1): p. 24-29.
153. Baptista, M.J., et al., *Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by  $\alpha$ -synuclein in human neuroblastoma cell lines*. Journal of Neurochemistry, 2003. **85**(4): p. 957-968.
154. Yang, Y.X. and D.S. Latchman, *Nurr1 transcriptionally regulates the expression of  $\alpha$ -synuclein*. NeuroReport, 2008. **19**(8): p. 867-871.
155. Liu, D., et al., *Silencing  $\alpha$ -Synuclein Gene Expression Enhances Tyrosine Hydroxylase Activity in MN9D Cells*. Neurochemical Research, 2008. **33**(7): p. 1401-1409.
156. Kriks, S., et al., *Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 547-551.
157. Ben-Hur, T., et al., *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors Improves Behavioral Deficit in Parkinsonian Rats*. STEM CELLS, 2004. **22**(7): p. 1246-1255.
158. Sundberg, M., et al., *Improved Cell Therapy Protocols for Parkinson's Disease Based on Differentiation Efficiency and Safety of hESC-, hiPSC-, and Non-Human Primate iPSC-Derived Dopaminergic Neurons*. STEM CELLS, 2013. **31**(8): p. 1548-1562.

159. Zhao, M., et al., *Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(13): p. 7925-7930.
160. Yoshimi, K., et al., *Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain*. Annals of Neurology, 2005. **58**(1): p. 31-40.
161. Van Kampen, J.M. and H.A. Robertson, *A possible role for dopamine D3 receptor stimulation in the induction of neurogenesis in the adult rat substantia nigra*. Neuroscience, 2005. **136**(2): p. 381-386.
162. Arzate, D.M., M. Guerra-Crespo, and L. Covarrubias, *Induction of typical and atypical neurogenesis in the adult substantia nigra after mouse embryonic stem cells transplantation*. Neuroscience, 2019. **408**: p. 308-326.
163. Rath, A., et al., *Survival and Functional Restoration of Human Fetal Ventral Mesencephalon following Transplantation in a Rat Model of Parkinson's Disease*. Cell Transplantation, 2013. **22**(7): p. 1281-1293.
164. Qian, H., et al., *Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons*. Nature, 2020. **582**(7813): p. 550-556.
165. Dehmelt, L. and S. Halpain, *The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins*. Genome Biology, 2004. **6**(1): p. 204.
166. Li, W., et al., *Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(20): p. 8299-8304.
167. Xiaoyan Qiu, Y.L., Xiong Xiao, Jingjing He, Huiyun Zhang, and Yuemin Li, *In Vitro Induction of Human Embryonic Stem Cells into the Midbrain Dopaminergic Neurons and Transplantation in Cynomolgus Monkey*. Cellular Reprogramming, 2019. **21**(6): p. 285-295.
168. Haining, R.L. and C. Achat-Mendes, *Neuromelanin, one of the most overlooked molecules in modern medicine, is not a spectator*. Neural regeneration research, 2017. **12**(3): p. 372-375.
169. Newman, A.M. and J.B. Cooper, *Lab-Specific Gene Expression Signatures in Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(2): p. 258-262.
170. Doi, D., et al., *Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation*. Stem Cell Reports, 2014. **2**(3): p. 337-350.
171. Brederlau, A., et al., *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation*. STEM CELLS, 2006. **24**(6): p. 1433-1440.
172. Chen, F., et al., *Oxidative Stress in Stem Cell Aging*. Cell transplantation, 2017. **26**(9): p. 1483-1495.
173. Abeliovich, A., et al., *Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System*. Neuron, 2000. **25**(1): p. 239-252.
174. Garcia-Reitboeck, P., et al., *Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra*. Experimental Neurology, 2013. **248**: p. 541-545.
175. Robertson, D.C., et al., *Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of  $\gamma$ -synuclein,  $\alpha$ -synuclein and double  $\alpha/\gamma$ -synuclein null mutant mice*. Journal of Neurochemistry, 2004. **89**(5): p. 1126-1136.
176. Dominici, C., et al., *Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance*. Nature, 2017. **545**(7654): p. 350-354.
177. Moreno-Bravo, J.A., et al., *Synergistic Activity of Floor-Plate- and Ventricular-Zone-Derived Netrin-1 in Spinal Cord Commissural Axon Guidance*. Neuron, 2019. **101**(4): p. 625-634.e3.
178. Serafini, T., et al., *The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6*. Cell, 1994. **78**(3): p. 409-424.

179. Vosberg, D.E., M. Leyton, and C. Flores, *The Netrin-1/DCC guidance system: dopamine pathway maturation and psychiatric disorders emerging in adolescence*. *Molecular Psychiatry*, 2020. **25**(2): p. 297-307.
180. Livesey, F.J. and S.P. Hunt, *Netrin and Netrin Receptor Expression in the Embryonic Mammalian Nervous System Suggests Roles in Retinal, Striatal, Nigral, and Cerebellar Development*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1997. **8**(6): p. 417-429.
181. Brundin, P., et al., *Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease*. *Experimental Brain Research*, 1986. **65**(1): p. 235-240.
182. Zaborszky, L. and C. Vadasz, *The Midbrain Dopaminergic System: Anatomy and Genetic Variation in Dopamine Neuron Number of Inbred Mouse Strains*. *Behavior Genetics*, 2001. **31**(1): p. 47-59.
183. Blum, M., *A null mutation in TGF- $\alpha$  leads to a reduction in midbrain dopaminergic neurons in the substantia nigra*. *Nature Neuroscience*, 1998. **1**(5): p. 374-377.
184. Nelson, E.L., et al., *Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: Computer-assisted mapping*. *Journal of Comparative Neurology*, 1996. **369**(3): p. 361-371.
185. Ahmad, S.O., et al., *Reduced numbers of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area of rats fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet: a stereological study*. *Neuroscience letters*, 2008. **438**(3): p. 303-307.
186. Finkelstein, D.I., et al., *Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra*. *Neuroscience*, 2000. **97**(1): p. 99-112.
187. Ip, C.W., D. Cheong, and J. Volkmann, *Stereological Estimation of Dopaminergic Neuron Number in the Mouse Substantia Nigra Using the Optical Fractionator and Standard Microscopy Equipment*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2017(127): p. 56103.
188. Björklund, L.M., et al., *Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(4): p. 2344-2349.



## 14. Anexos

**Tabla anexa 1. Resumen de resultados de la diferenciación dopaminérgica en cultivo.**

<b>Cultivo celular</b>			
<b>Placa de piso</b>			
<b>Línea celular</b>	<b>Control</b>	<b>3X SNCA</b>	<b>SNCA KO</b>
<b>Fenotipo neuronal</b>	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)
<b>% de neuronas Lmx1a+</b>	6.86 $\pm$ 1.73	5.07 $\pm$ 2.39	1.82 $\pm$ 1.18
<b>% de neuronas TH+</b>	7.34% $\pm$ 1.30	3.12% $\pm$ 0.81	3.49% $\pm$ 0.56
<b>Quinto día de la fase de maduración</b>			
<b>Línea celular</b>	<b>Control</b>	<b>3X SNCA</b>	<b>SNCA KO</b>
<b>Fenotipo neuronal</b>	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+</b>	64.26 % $\pm$ 6.20	74.04 % $\pm$ 2.97	0%
<b>% de neuronas TH+</b>	59.63% $\pm$ 3.11	46.66% $\pm$ 3.39	44.07 % $\pm$ 3.49
<b>% de neuronas Lmx1a+</b>	60.11 $\pm$ 6.02	44.73 $\pm$ 2.84	72.98 $\pm$ 4.10
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+ - TH+ del total de células</b>	39.20% $\pm$ 5.64	37.12% $\pm$ 4.08	0%
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+ - TH+ / <math>\alpha</math>-sinucleína</b>	60.09% $\pm$ 4.92	49.55% $\pm$ 4.16	0%
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+ - TH+ / TH+</b>	64.67% $\pm$ 6.45	78.16% $\pm$ 3.36	0%
<b>Cultivo celular en el decimoquinto día de la fase de maduración</b>			
<b>Línea celular</b>	<b>Control</b>	<b>3X SNCA</b>	<b>SNCA KO</b>
<b>Fenotipo neuronal</b>	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)
<b>% de neuronas Lmx1a+</b>	67.56 $\pm$ 7.21	68.47 $\pm$ 4.89	74.10 $\pm$ 3.45
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+</b>	37.12% $\pm$ 2.78	68.93 % $\pm$ 2.76	0%
<b>% de neuronas TH+</b>	24.76% $\pm$ 2.28	48.14% $\pm$ 2.59	62.18% $\pm$ 12.24
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+ - TH+ del total de células</b>	10.15% $\pm$ 1.42	34.04% $\pm$ 3.35	0%
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+ - TH+ / <math>\alpha</math>-sinucleína</b>	27.76% $\pm$ 4.02	49.00% $\pm$ 4.10	0%
<b>% de neuronas <math>\alpha</math>-sinucleína+ - TH+ / TH+</b>	41.95% $\pm$ 5.60	69.35% $\pm$ 4.04	0%

TH, tirosina hidroxilasa.

**Tabla anexa 2. Resumen de resultados de los trasplantes realizados en etapa de placa de piso.**

<b>Trasplante celular en etapa de Placa de Piso</b>				
<b>Tipo de lesión</b>	<b>SN con solución salina</b>		<b>SN lesionada</b>	
<b>Tiempo del trasplante</b>	15 dpt	2 mpt	15 dpt	2 mpt
<b>% de animales que presentan sobrevivencia del trasplante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 60%</li> <li>• 3X SNCA 50%</li> <li>• SNCA KO 100%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 60%</li> <li>• 3X SNCA 80%</li> <li>• SNCA KO 60%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 55.5%</li> <li>• 3X SNCA 28.5%</li> <li>• SNCA KO 62.5%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 37.5%</li> <li>• 3X SNCA 37.5%</li> <li>• SNCA KO 50%</li> </ul>
<b>Fenotipo neuronal</b>	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3X SNCA y SNCA KO en proceso de maduración (<math>\beta</math>-III tubulina+ / <math>\downarrow</math>doblecortina)</li> <li>• Control con fenotipo neuronal inmaduro (<math>\beta</math>-III tubulina+ /doblecortina+)</li> </ul>	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doblecortina+)
<b>Fenotipo dopaminérgico</b>	Baja expresión de TH	Baja expresión de TH	Baja expresión de TH	Baja expresión de TH
<b>Coefficiente de Pearson TH y SC121</b>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control <math>0.13 \pm 0.05</math></li> <li>• 3X SNCA <math>0.06 \pm 0.02</math></li> <li>• SNCA KO <math>0.10 \pm 0.02</math></li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control <math>0.016 \pm 0.03</math></li> <li>• 3X SNCA <math>0.079 \pm 0.03</math></li> <li>• SNCA KO <math>0.13 \pm 0.01</math></li> </ul>
<b>Comportamiento motor a 2 mpt</b>	<b>Pretrasplante</b>		<b>1 mpt</b>	<b>2 mpt</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de trasplante <math>384.22 \pm 36.78</math></li> <li>• Control <math>533.8 \pm 63.70</math></li> <li>• 3X SNCA <math>479.3 \pm 50.04</math></li> <li>• SNCA KO <math>560.6 \pm 78.81</math></li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de trasplante <math>574.4 \pm 105.9</math></li> <li>• Control <math>640.0 \pm 109.8</math></li> <li>• SNCA KO <math>541.3 \pm 69.15</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de trasplante <math>650.2 \pm 93.39</math></li> <li>• Control <math>769.3 \pm 77.16</math></li> <li>• SNCA KO <math>404.1 \pm 130.9</math></li> </ul>

TH, tirosina hidroxilasa; 6-OHDA, 6-hidroxi dopamina, SN, sustancia nigra.

**Tabla anexa 3. Resumen de resultados de los trasplantes realizados en el quinto día de la fase de maduración dopaminérgica.**

<b>Trasplante con células del quinto día de la fase de maduración dopaminérgica</b>				
<b>Tipo de lesión</b>	<b>SN con solución salina</b>		<b>SN con 6-OHDA</b>	
<b>Tiempo del trasplante</b>	<b>15 dpt</b>	<b>2 mpt</b>	<b>15 dpt</b>	<b>2 mpt</b>
<b>% de animales que presentan supervivencia del trasplante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 60%</li> <li>• 3X SNCA 20%</li> <li>• SNCA KO 40%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 40%</li> <li>• 3X SNCA 0%</li> <li>• SNCA KO 20%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 33.3%</li> <li>• 3X SNCA 50%</li> <li>• SNCA KO 42.85%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control 37.5%</li> <li>• 3X SNCA 0%</li> <li>• SNCA KO 25%</li> </ul>
<b>Fenotipo neuronal</b>	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doble cortina+)	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doble cortina+)	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doble cortina+)	Neuronal inmaduro en las tres líneas celulares ( $\beta$ -III tubulina+ /doble cortina+)
<b>Fenotipo dopaminérgico</b>	Baja expresión de TH	Baja expresión de TH	Baja expresión de TH	Baja expresión de TH
<b>Coefficiente de Pearson TH y SC121</b>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control <math>0.098 \pm 0.02</math></li> <li>• 3X SNCA: sin supervivencia</li> <li>• SNCA KO <math>0.016 \pm 0.01</math></li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control <math>0.11 \pm 0.02</math></li> <li>• 3X SNCA: sin supervivencia</li> <li>• SNCA KO <math>0.12 \pm 0.04</math></li> </ul>
<b>Comportamiento motor a 2 mpt</b>	<b>Pretrasplante</b>	<b>1 mpt</b>	<b>2 mpt</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de trasplante <math>384.22 \pm 36.78</math></li> <li>• Control <math>655.8 \pm 105.8</math></li> <li>• 3X SNCA <math>450.8 \pm 42.26</math></li> <li>• SNCA KO <math>454.9 \pm 63.49</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de trasplante <math>574.4 \pm 105.9</math></li> <li>• Control <math>381.9 \pm 101.1</math></li> <li>• SNCA <math>771.2 \pm 97.28</math></li> <li>• SNCA KO <math>570.3 \pm 199.4</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de trasplante <math>650.2 \pm 93.39</math></li> <li>• Control <math>468.6 \pm 77.76</math></li> <li>• SNCA <math>446.8 \pm 87.58</math></li> <li>• SNCA KO <math>339.4 \pm 87.59</math></li> </ul>	

TH, tirosina hidroxilasa; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina, SN, sustancia nigra.