



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DEL GDNF EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA UNIÓN
NEUROMUSCULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

B.Q.D. José Fernando Becerra Vélez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mónica Lamas Gregori
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, Sede Sur
Dra. Susana Castro Obregón
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México, junio 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El trabajo aquí presentado se realizó en el laboratorio del Dr. Iván Velasco Velázquez en el instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Agradezco al comité tutorial por su apoyo para la realización de este proyecto.

Dra. Mónica Lamas Gregori	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, Sede Sur
Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología celular

Al apoyo otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Papiit-IN213719).

A CONACyT por el apoyo con una beca de maestría durante la realización de mis estudios (CVU: 929431)

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas

Al jurado de mi examen para la obtención del grado de maestría, constituido por:

Presidente	Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Vocal	Dra. Magdalena Guerra Crespo
Vocal	Dra. Herminia Pasantes Ordoñez
Vocal	Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
Secretario	Dra. María Antonieta Chávez González

A los Drs. Enrique Estudillo y Ruth Rincón, por su tiempo y apoyo en la adquisición de imágenes por microscopía.

A la Dra. Karla María del Carmen Méndez Maldonado por su apoyo en cuanto pudo en mi formación para desarrollar este trabajo.

A la Dra. Itzel Escobedo Ávila por su apoyo en la adquisición y en el manejo de material y reactivos utilizados en el proyecto.

Las imágenes de microscopía confocal presentadas en este trabajo se tomaron usando el sistema A1R HD25 (Nikon Co. Tokio, Japón) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, cuya adquisición fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto número 300461.

Dedicatorias

A mis padres, especialmente a mi papá, quien recibía con gran emoción cada uno de mis logros. Gracias a ambos por su apoyo incondicional y compañía cuando lo he necesitado.

A mis hermanos, por ser mis guías y acompañantes.

Al Dr. Iván, por su gran apoyo, confianza y paciencia.

A mis compañeros y amigos de carrera; Mel, Esme, Alfred y Gio, por acompañarme en tantos equipos y experiencias.

A los amigos que conocí y retomé en este tiempo, Karla, Xóchitl, Paco, Abi, Fer, Sara, Nara, Are y Axel.

A todos mis compañeros de laboratorio que me enseñaron mucho en este tiempo, especialmente a Karla Méndez por contribuir en mi formación en cuanto pudo.

A los integrantes del Instituto de Fisiología Celular que me asesoraron y dieron consejos.

A mi Universidad, que me ha dado tantas experiencias.

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Resumen	8
Antecedentes.....	9
Características de las células troncales.....	9
Células troncales embrionarias de ratón	9
Desarrollo embrionario de las motoneuronas	10
Organización de las motoneuronas	13
Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón (mESC) a motoneuronas de la médula espinal	14
Inducción de la supervivencia de las MNs por factores neurotróficos	14
<i>Factor neurotrófico derivado de células gliales</i>	14
Papel del GDNF sobre la diferenciación de las motoneuronas a partir de mESC	15
Desarrollo del músculo esquelético	15
Mioblastos C2C12.....	16
La unión neuromuscular y su desarrollo	16
.....	17
Actividad de la unión neuromuscular	17
Hipótesis.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos particulares	18
Métodos.....	18
Generación de las mESC-control y mESC-GDNF	18
Cultivo de mESC.....	19
Formación de cuerpos embrioides (EB), diferenciación y siembra de motoneuronas ...	19
Síntesis de cDNA a partir de RNA total de mESC y qPCR.....	20
Inmunofluorescencia	21
Cultivo y diferenciación de los MB C2C12.....	21
Identificación de micoplasma en cultivos celulares.....	21
Tratamiento de líneas celulares infectadas con micoplasma	22
Preparación de la Cámara de crecimiento axonal para el co-cultivo de motoneuronas y mioblastos C2C12.....	22
Cámaras de microfluidos.....	23
Co-cultivo de motoneuronas y mioblastos C2C12 en las cámaras de crecimiento axonal	24
Resultados.....	25

Cultivo de mESC y análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia	25
Expresión de los mRNA de pluripotencia en células HBG3 cultivadas con o sin 2i	27
Selección de colonias de células HBG3	28
Diferenciación de mESC HBG3 a MNs.....	30
Diferenciación de las mESC Control y mESC GDNF.....	32
Diferenciación de los mioblastos C2C12	35
Co-cultivo de motoneuronas con MB.....	35
Discusión	43
Conclusión.....	46
Apéndice 1.....	47
Geles para el análisis de las muestras utilizadas en la RT-qPCR.....	47
Apéndice 2.....	48
Identificación y eliminación de micoplasma en diferentes líneas celulares.	48
Referencias	50

Abreviaturas

AR	Ácido retinoico
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés <i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BMP	Proteína morfogenética de hueso, del inglés <i>bone morphogenetic protein</i>
CCA	Cámara de crecimiento axonal
ChAR	Receptor de acetil colina, del inglés <i>Choline acetyl receptor</i>
ChAT	Acetil colin transferasa, del inglés <i>Choline acetyl transferase</i>
CNS	Sistema nervioso central, del inglés <i>Central nervous system</i>
CNTF	Factor neurotrófico ciliar, del inglés <i>Ciliary neurotrophic factor</i>
EB	Cuerpo embrioides, del inglés <i>Embryoid body</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés <i>Fibroblast growth factor</i>
Fn	Fibronectina
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales, del inglés <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFL	del inglés <i>GDNF Family Ligands</i>
GFR	Del inglés <i>GDNF Family Receptor</i>
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i>green fluorescent protein</i>
Gli	del inglés <i>Gli-Kruppel family</i>
GliA	Proteínas Gli activadoras
GliB	Proteínas Gli represoras
HB9	Del inglés <i>Homeobox Protein HB9</i>
HBG3	Línea celular de mESC con expresión de la GFP bajo el promotor Hb9
LIF	Factor inhibidor de leucemia, del inglés <i>Leukemia inhibitory factor</i>
Lm	Laminina
MAP	Proteínas activadas por mitógenos, del inglés <i>mitogen-activated protein</i>
MB	Mioblasto
mESC	Células troncales embrionarias de ratón, del inglés <i>mouse Embryonic Stem Cells</i>
MN	Motoneurona
NANOG	Nanog Homeobox
NMJ	Unión neuromuscular, del inglés <i>Neuromuscular junction</i>
NT-3	Neurotrofina 3
Oct4	Del inglés <i>Octamer-Binding Protein 4</i>
Olig2	Factor de transcripción de oligodendrocitos, del inglés <i>Oligodendrocyte transcription Factor 2</i>
PBS	Del inglés <i>Phosphate buffer saline</i>
PLO	Poli L-ornitina
RT-qPCR	Del inglés <i>Retrotranscription and quantitative polymerase chain reaction</i>
SAG	Del inglés <i>Smoothed receptor agonist</i>

Shh	Del inglés Sonic Hedghog
Sox2	Del inglés <i>SRY-Box Transcription factor 2</i>
SSEA1	Antígeno de estadio embrionario específico 1, del inglés <i>Specific stage embryonic antigen 1</i>
TN	Tubo neural
tSC	Del inglés <i>terminal Schwann cell</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>

Resumen

Las uniones neuromusculares tienen la función de conectar el sistema nervioso con el muscular, para estimular la contracción voluntaria de los músculos. Alguna alteración en la parte neural o muscular genera la pérdida en el control motor.

El factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), es una neurotrofina capaz de aumentar la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y motoneuronas (MNs). Su uso en modelos que comprendan únicamente las unidades estructurales de la unión neuromuscular puede contribuir en el estudio de los efectos directos que esta proteína tiene en el establecimiento del contacto neurona-músculo.

El empleo de células troncales para la generación de tipos celulares específicos es atractivo porque disminuye el número de animales que se requieren para realizar ciertos experimentos, además de que las modificaciones de su genoma perduran en las células a las que se diferencian, con lo que, entre muchas posibilidades, se pueden utilizar para estudiar mutaciones de diferentes patologías o el efecto de la expresión de una proteína determinada.

En este trabajo, utilizamos protocolos de diferenciación establecidos previamente. Co-cultivamos MNs diferenciadas de células troncales embrionarias de ratón (mESC) con y sin expresión de GDNF, junto con miotubos diferenciados de mioblastos C2C12 (MBs) en cámaras de crecimiento axonal, de forma que los cuerpos celulares de ambos tipos celulares quedaran aislados entre sí y se pudieran observar aquellos axones capaces de extenderse y contactar con las células musculares.

Con el protocolo que seguimos, encontramos que las MNs con expresión constitutiva de GDNF cruzan y establecen uniones neuromusculares en mayor cantidad comparadas a las MNs control. Experimentos *in vivo* o *in vitro* que evalúen la extensión axonal de las MNs, cuando se administra el GDNF sobre sus somas, durante y/o después de su generación, podría brindar un mayor panorama de este efecto del GDNF.

A diferencia de otros trabajos, en los que se atribuye al GDNF una actividad neurotrófica, en esta tesis se sugiere que también participa en la capacidad que tienen las MNs para extender sus axones y contactar sus células blanco.

Antecedentes

Características de las células troncales

Una célula troncal es aquella que posee dos cualidades la primera, es la autorrenovación, que consiste en generar células hijas semejantes a la célula madre, y la segunda, el potencial para dar lugar a células hijas con un mayor grado de especialización, proceso conocido como diferenciación. Las decisiones para autorrenovarse o diferenciarse, dependen de las señales que reciben en su microambiente (Schofield, 1978).

Las células troncales pueden clasificarse conforme a su capacidad para generar uno, varios o todos los tipos celulares (somático o germinal) de un organismo, por lo que se dice que son unipotentes, multipotentes o pluripotentes, respectivamente (Singh et al., 2016).

Células troncales embrionarias de ratón

Las células troncales embrionarias de ratón (mESC, de *mouse embryonic stem cells*) son células pluripotentes con cariotipo normal, que se obtienen de la masa celular interna del blastocisto (Evans & Kaufman, 1981). Desde su establecimiento en 1981 (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981) se han desarrollado protocolos con algunas variaciones para su mantenimiento *in vitro* (Tremml et al., 2008). En un principio, se sembraron sobre una monocapa de *feeders* o fibroblastos murinos inactivados mitóticamente (Martin, 1981; Evans y Kaufman, 1981); más adelante, se pudo prescindir de estas células alimentadores cuando se incluyó el factor inhibitorio de leucemia (*LIF*, del inglés *leukemia inhibitory factor*) (Williams et al., 1988). En 2003, Ying y colaboradores revelaron que además de LIF, se requería de la proteína morfogenética de hueso 4, presente en el suero de cultivo, para conservar la pluripotencia de las mESC.

Después de reconocer a las moléculas que mantenían la pluripotencia en las mESC, se realizaron acercamientos para mejorar su cultivo. Ying y colaboradores (2008), probaron satisfactoriamente inhibidores de proteínas relacionadas con la proliferación celular; cuando adicionaron LIF junto con los inhibidores PD03925901 (inhibidor de la vía de las MEKs) y CHIR 99021 (inhibidor de GSK3 β que mimetiza la activación de la vía canónica de Wnt) aumentaron la eficiencia del cultivo de las células pluripotentes.

Fenotípicamente, las mESC expresan proteínas presentes en la masa celular interna del blastocisto. Algunas de ellas, son: Fosfatasa alcalina, Oct4, SSEA1

(*Stage specific embryonic antigen-1*), NANOG y Sox2 (Avilion et al., 2003; Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Nichols et al., 1998; Solter & Knowles, 1978; Vorbrodt et al., 1977; Zhao et al., 2012). De estos marcadores, interesantemente, Sox2 y Oct4 también participan en la troncalidad de células diferentes a las mESC; Sox2, se asocia a progenitores neurales y epidermales bucales, además de células que participan en la formación del esófago, el estómago anterior y el desarrollo del ojo (Graham et al., 2003; Juuri et al., 2012; Kamachi et al., 1998; Que et al., 2007), entre otros; mientras que Oct4, se expresa también en células troncales de tejidos hematopoyéticos, mesenquimales y renales (Goolsby et al., 2003; Gupta et al., 2006; Jiang et al., 2002; Lengner et al., 2007).

Las mESC tienen un gran valor en la investigación; permiten estudiar diferentes procesos celulares involucrados en el desarrollo embrionario, permiten generar *in vitro* células de cualquier tejido celular del individuo adulto y proporcionan bases para el desarrollo a futuro de un abanico de terapias celulares. Su estudio se ha facilitado y enriquecido gracias a las técnicas de biología molecular entre algunas otras. Como un ejemplo al respecto, existe la línea celular HBG3, la cual, son mESC que al diferenciarse a MNs tienen fluorescencia y pueden distinguirse de otros tipos celulares; esto, porque fueron modificadas genéticamente con un transgén de la GFP (*green fluorescent protein*) bajo el promotor del gen *Homeobox Hb9*, una gen que se expresa específicamente en MNs (Wichterle, Hynek, Liebaram, I., Porter, J. y Jessel, 2002).

Desarrollo embrionario de las motoneuronas

Después de las primeras divisiones celulares del embrión y formación de la blástula, el embrión en etapa de blastocisto se implanta y posteriormente comienza la gastrulación, etapa en la que se originan las tres capas germinales de las que se derivan todos los tejidos del organismo: ectodermo, mesodermo y endodermo (Ang & Behringer, 2002).

El ectodermo da origen a la epidermis y al tejido nervioso a partir del proceso conocido como neurulación. Ésta es compleja e involucra varias señales morfogenéticas espacio-temporales que han sido estudiadas desde hace ya varios años en diferentes modelos animales. Smith y Schoenwolf (1997) describen en su revisión que la neurulación ocurre en cuatro fases: 1) dentro del ectodermo se establece un epitelio neural denominado placa neural (PN); 2) en la PN ocurren cambios morfológicos celulares, además de una expansión rostro-caudal; 3) se forman 3 puntos bisagra en la PN, dos dorsolaterales y uno medial, que participan en su plegamiento en forma de tubo; y 4) los extremos de la PN se contactan, así

como los epitelios epidermales que los acompañan, para cerrar el tubo neural (TN) y formar el ectodermo epitelial continuo.

La formación del TN ocurre progresivamente en el embrión con dirección antero-posterior. Conforme esto ocurre, primero se desarrollan las estructuras más anteriores (i.e. cerebro anterior, medio y posterior) y a continuación, las posteriores (i.e. médula espinal); esto se debe a que el ectodermo que formará la PN requiere de señales dadas por la notocorda y mesodermo paraxial, estructuras que también se forman con dirección antero-posterior y secretan a los inhibidores de proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), Cordina y Nogina.

La regionalización del tubo neural está marcada por la presencia de proteínas, como los factores de transcripción Otx2, Gbx2 y las derivadas de los genes *Hox* (Matsuo et al., 1995; Simeone et al., 1992; Wassarman et al., 1997), así como los morfógenos Wnt1, Shh y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) (Crossley & Martin, 1995; J. Ericson et al., 1995; Heikinheimo et al., 1994; Hollyday et al., 1995; McMahon & Bradley, 1990; Roelink et al., 1995) (ver Figura 1).

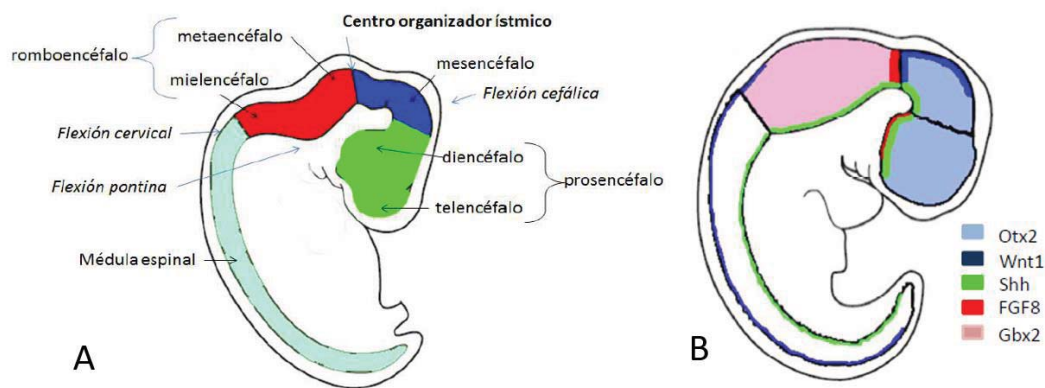


Figura 1. Representación de las estructuras, factores de transcripción y morfógenos involucrados en la formación del tejido neural en el embrión de ratón E10.5-11. A) Corte sagital de un embrión de ratón en el día embrionario (E)10.5-11, en donde se muestran la regionalización antero-posterior del tubo neural. B) Corte sagital del embrión de ratón en el día E10.5-11, que muestra los sitios de expresión de los factores transcripcionales Otx2 y Gbx2, así como los morfógenos Wnt1, Shh y FGF8. Tomadas de Cortés, et al. (2017).

Las MNs, un conjunto de neuronas especializadas, tienen la función de estimular glándulas y modular la contracción del músculo liso o esquelético. Aquellas MNs que inervan directamente al músculo esquelético, se originan y localizan su soma en las regiones del TN correspondientes al tronco encefálico y la región ventral de la médula espinal en el individuo adulto. A pesar de originarse en el sistema nervioso central (CNS), sus axones forman nervios que se elongan hacia sus músculos

blanco en la periferia, y por ende, son consideradas parte del sistema nervioso periférico (Purves et al., 2018).

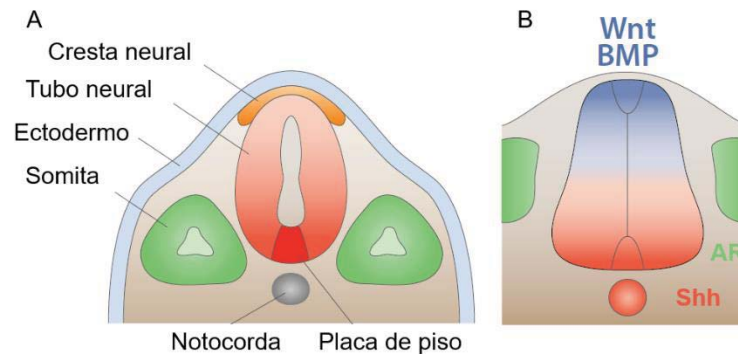


Figura 2. Tejidos cercanos al tubo neural y morfógenos involucrados en la regionalización neural dorso-ventral. **A** y **B**) Cortes transversales del tubo neural a la altura de la médula espinal. **A**) Se esquematizan las estructuras importantes que participan en la diferenciación del tejido nervioso. La porción ventral del TN (*floor plate*) está próxima a la notocorda. En la parte dorsal del tubo neural se genera la cresta neural. **B**) Representación de las zonas en las que se secreta Shh por la notocorda y la placa del piso, así como Wnt y BMP por la placa de techo y ácido retinoico por las somitas o mesodermo paraxial. La intensidad de color muestra el gradiente de concentración del Shh, Wnt y BMP, observándose en las zonas de color más oscuro, mayor concentración de los morfógenos Wnt/BMP (en azul) y Shh (en rojo); *Wingless-related integration site* (Wnt), *Bone morphogenetic proteins* (BMPs), ácido retinoico (AR) y *Sonic hedgehog* (Shh). Modificadas de Stifani (2014).

En la bibliografía, se ha reportado que las MNs pertenecientes a la porción más rostral de la médula espinal, se forman como consecuencia de la estimulación del TN con ácido retinoico (AR) y un gradiente de Shh, provenientes del mesodermo paraxial y notocorda/placa de piso, respectivamente (Figura 2) (Johan Ericson et al., 1996; Muhr et al., 1999). La formación de MNs de porciones más posteriores se asocia a un aumento de estimulación por FGF8 (Dasen et al., 2003). Las acciones de los gradientes opuestos de Wnt/BMP y Shh en el eje dorso-ventral del TN regulan la actividad de proteínas Gli (*Gli-Kruppel family*) activadoras (GliA) y represoras (GliR), que activan la expresión de un código de factores de transcripción que comprometen a las poblaciones celulares hacia su futura identidad en el TN (Figura 3). Las células progenitoras de MNs expresan los factores de transcripción Olig2 y Pax6 (Ericson et al., 1997; Novitch, Chen, & Jessell, 2001), mientras que las MN postmitóticas expresan el factor de transcripción Hb9 (Arber et al., 1999)

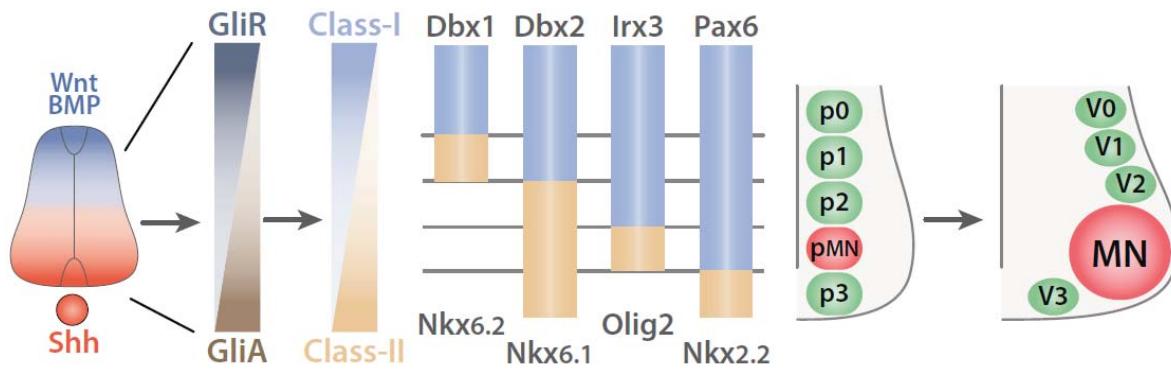


Figura 3. Participación del gradiente dorso-ventral de *Shh* y *BMPs/Wnt* para la diferenciación hacia *MNs* e interneuronas en la porción ventral de la médula espinal. Los gradientes de *Shh* (en rojo) y *BMPs/Wnt* (en azul) secretados por la notocorda, la placa de piso y la placa de techo promueven, a través de proteínas *Gli* activadoras (*GliA*) o represoras (*GliR*), la expresión de factores de transcripción de clase I y clase II (en azul y café claro), que determinan la identidad de los progenitores celulares en la porción ventral de la médula espinal. p0, p1, p2, p3 y pMN: Dominios de los progenitores (p) de interneuronas (p0-3) y MNs (pMN); A la derecha se representan los dominios con interneuronas (V0, V1, V2, V3) y MNs ya diferenciadas (MN). Proteínas de clase I: *Dbx1/2*: *brain homeobox 1/2*; *Irx3*: *Iroquois related homeobox 3*; *Pax6*: *Paired box 6*. Proteínas de clase II: *Nkx6.1/6.2/2.2*; *NK homeobox 6.1/6.2/2.2*; Tomada de Stifani (2014).

Organización de las motoneuronas

Los diferentes tipos de MNs se originan de un solo dominio ventral, sin embargo, en periodos futuros del desarrollo, se observa una clara distribución en 1) agrupaciones locales, o *pools de MNs*, que inervan solo a un músculo, y además, en 2) columnas nerviosas, que suelen tomar una posición en la médula espinal de acuerdo con la posición anatómica de su blanco. Por ejemplo, las que inervan los músculos más proximales a la médula espinal son aquellas MNs de la columna que se encuentran en una posición más medial, mientras que aquellas MNs de columnas más laterales inervan los músculos distales (Figura 4) (Kanning et al., 2010)

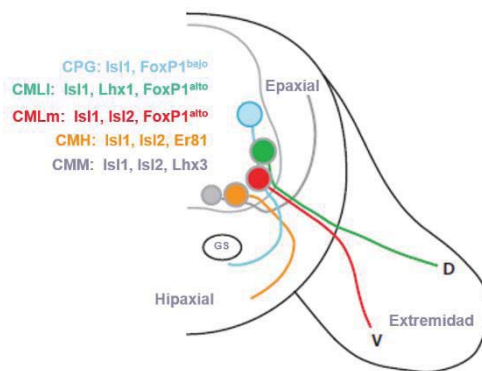


Figura 4. Columnas motoras en la médula espinal y sus diferentes blancos. Ubicación, marcadores y blancos de las columnas motoras, en la médula espinal embrionaria. La columna motora medial (CMM) tiene MNs que inervan musculatura epaxial; la columna motora hipaxial (CMH) inerva musculatura hipaxial. Las subdivisiones medial y lateral de la columna motora lateral (CMLm y CMLi) inervan los músculos ventrales (V) y dorsales (D) de la extremidad respectivamente, y la columna preganglionar (CPG) inerva los ganglios simpáticos (GS). *Isl1/2* (*Insulin Gene Enhancer Protein ISL 2/3*); *FoxP1* (*Forkhead box protein P1*); *Er81* (*ETS Variant Transcription Factor*); *Lhx3* (*Lim/homeobox protein 3*) Modificada de Kanning et al., (2010).

Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón (mESC) a motoneuronas de la médula espinal

Los protocolos para diferenciar las mESC a MNs están basados en la formación de cuerpos embrioides, agregados celulares derivados de células troncales embrionarias (Kurosawa, 2007), y en la estimulación con AR y un agonista de Shh (Wichterle, et al., 2002); como se mencionó anteriormente, el primero especifica un fenotipo caudalizante en el desarrollo neural, y el segundo, genera un patrón de identidad celular ventral. Como alternativas al uso de Shh en la diferenciación *in vitro*, se utilizan purmorfamina o *Smoothened agonist* (SAG), ambos agonistas de la vía de Shh (Sinha y Chen, 2006; Wang et al. 2010).

Igual que en condiciones *in vivo*, los progenitores de MNs derivadas de mESC, pueden identificarse por la expresión de los factores transcripcionales Olig2, Nkx6.2 y Pax6 (Figura 3), mientras que las MNs post-mitóticas presentan la proteína Hb9, la enzima colina acetil transferasa (ChAT, de *Choline-acetyl transferase*) y el transportador vesicular de acetilcolina (vAChT) (Vilmont, et al., 2016).

Inducción de la supervivencia de las MNs por factores neurotróficos

Los factores tróficos son proteínas que aumentan el crecimiento y la viabilidad celular (Li et al., 2019). Entre estos, están el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, de *glial cell line-derived neurotrophic factor*), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, de *vascular endothelial growth factor*), el factor neurotrófico ciliar (CNTF, de *ciliary neurotrophic factor*) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, de *insulin-like growth factor 1*).

Factor neurotrófico derivado de células gliales

El GDNF fue inicialmente caracterizado como un factor soluble extraído del medio condicionado de la línea de células gliales B49, que promovió la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en cultivo (Lin et al., 1993). Más tarde se descubrieron 3 moléculas homólogas a esta: neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) (Baloh et al., 1998; Kotzbauer et al., 1996; Milbrandt et al., 1998). En conjunto, forman a la familia de ligandos GDNF (GFL: *GDNF Family Ligands*). Estas moléculas tienen función fisiológica como homodímeros e interesantemente, forman parte de la familia de TGF- β al presentar un nudo de cisteína (CYSTEINE-KNOT) (ver Airaksinen y Saarma, 2002).

Los mecanismos de acción sugeridos para los GFL son básicamente dos. En ambos, ocurren la homodimerización de dos moléculas GFL en el espacio extracelular (p. ej. GDNF-GDNF o artemina-artemina), que interactúan con un homodímero del co-receptor GFR (*GDNF Family Receptor*), y juntos se unen a los receptores transmembranales con actividad de tirosina cinasa RET. Estos receptores de tirosina cinasa comienzan una señalización río abajo en el interior de la célula. La diferencia entre los mecanismos propuestos radica en la localización del GFR, que puede estar en el espacio extracelular o embebido a la membrana (Airaksinen y Saarma, 2002).

Los receptores RET, una vez activados, pueden interactuar con la proteína embebida en la membrana plasmática FRS2 (*Fibroblast growth factor substrate 2*) y estimular la vía de las MAP cinasas, o bien, con la proteína soluble intracelular Shc (*Src-homologous and collagen like-protein*), y estimular la vía de señalización de Akt (Airaksinen y Saarma, 2002).

Otra de las funciones reportadas para el GDNF, es su participación en la separación de los axones de las subpoblaciones lateral y medial de la columna motora lateral, a través del receptor Ret y EphA. Además, el GDNF junto con NCAM y GFR α 1 permite la respuesta repulsiva de los axones comisurales a Semaforina 3B (Onesto et al., 2021).

Papel del GDNF sobre la diferenciación de las motoneuronas a partir de mESC

Previamente a este proyecto, Cortés y colaboradores (2017) reportaron que la expresión constitutiva y transgénica de GDNF, durante el proceso de diferenciación de mESC a MNs, aumenta la proliferación de precursores neurales, así como la cantidad de MNs obtenidas, además de incrementar su madurez y su resistencia a la excitotoxicidad. Para ello, establecieron y utilizaron dos líneas celulares que también se utilizaron en este proyecto, las mESC-control y mESC-GDNF (Ver métodos).

Desarrollo del músculo esquelético

En el desarrollo del ratón, la expresión de proteínas de músculo esquelético (p. ej. Desmina) comienza con la aparición de los primeros mioblastos en las somitas del día E9, que desde entonces se mantienen en constante proliferación y maduran a miotubos desde el día E13 hasta después del nacimiento (Furst et al., 1989).

El músculo esquelético está constituido por agrupaciones lineales de miofibrillas, similares a un cable; a aquellas que recorren el interior de esta agrupación lineal se

les denomina intrafusales, y a las que lo hacen en la parte periférica extrafusales: las primeras se subcategorizan en fibras dinámicas de la bolsa nuclear (B1), fibras estáticas de la bolsa nuclear (B2), y fibras de la cadena nuclear. Por su parte, las extrafusales se dividen en contracción lenta (*slow-twitch*) resistentes a fatiga (SFR del inglés *slow-twitch fatigue-resistant*); contracción rápida resistente a fatiga (FFR, del inglés *fast-twitch fatigue-resistant*), y contracción rápida fatigable (FF, del inglés *Fast-twitch fatigable*) (Stifani, 2014). El tipo, predominio o cantidad de estas fibras en un músculo está relacionado con la retroalimentación necesaria para mantener la coordinación locomotora y con su función (p. ej., correr, sostener, tomar un objeto con la mano).

Mioblastos C2C12

La línea celular de MBs, son células aisladas del músculo gastrocnemio de la cepa de ratón C3H (Yaffe & Saxel, 1977); estas células tienen la capacidad de diferenciarse a miotubos con expresión de marcadores de contracción rápida o lenta, cuando se cultivan en baja concentración de suero (Chen et al., 2018).

La unión neuromuscular y su desarrollo

Las uniones neuromusculares (NMJs, *Neuromuscular junction*), son sitios anatómicos compuestos de células musculares (CMs), MNs y células de Schwann terminales (Li, Xiong y Mei, 2018). Dichas estructuras, tienen la función de conectar el sistema nervioso con el muscular, para estimular la contracción voluntaria de los músculos.

En el desarrollo, después de la derivación de los mioblastos en el embrión de ratón, al día E10.5, su diferenciación y fusión ocurre rápidamente. Las fibras multinucleadas resultantes, expresan entre los días E11-12, *clusters* de receptores de acetilcolina (AChR, del inglés *Acetyl choline receptor*) en un proceso llamado *muscle prepatternning*. Conforme los axones de las MN se elongan sobre estas fibras y las inervan, el patrón de los *clusters* se modifica, desaparecen los existentes y reaparecen otros con forma oval, con forma de pretzel, que interactuarán con diferentes botones terminales de las MN (E16-P14) (Figura 5). Es en el estadio adulto cuando ocurre una selección de botones terminales de las MN y cada *cluster* termina siendo inervado por una sola MN, se establece la unión neuromuscular. Cuando la NMJ está madura morfológicamente, se observan en el sitio de sinapsis las crestas musculares, la lámina basal sináptica, las vesículas presinápticas, entre otras (Figura 5B).

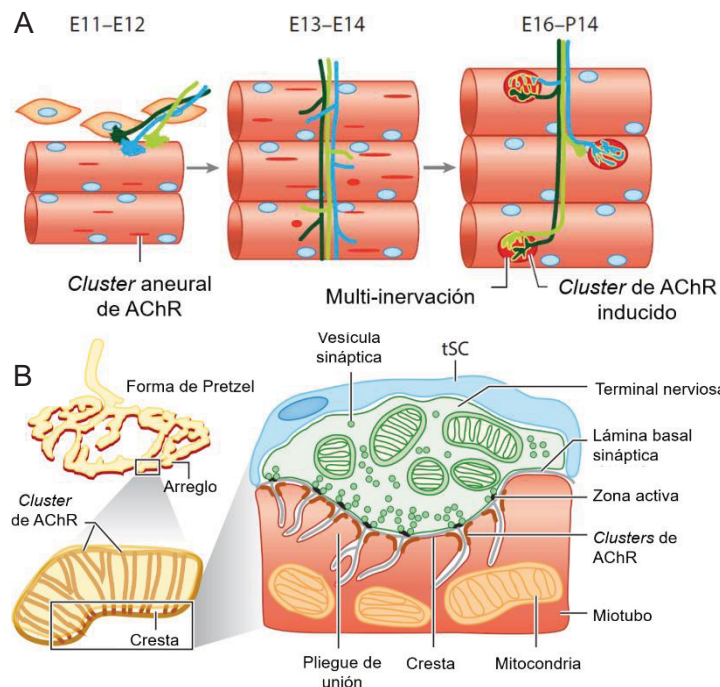


Figura 5. Desarrollo de la NMJ en ratones. A) Formación de la NMJ en ratones desde el día embrionario E11 hasta el día postnatal P14; entre E11-E12, los mioblastos se fusionan y en ellos se generan *clusters* de AChR (líneas rojas) en ausencia de axones de MNs; entre E13-E14 las MNs extienden sus axones al mismo tiempo que inervan fibras musculares, provocando la aparición de los *clusters* definitivos de AChR (puntos rojos); entre E16-P14, más de un axón inerva el mismo *cluster* definitivo de AChR. **B)** Estructura de pretzel, constituida por botones presinápticos de una MN y los *clusters* de AChR de las fibras musculares. En la ampliación de las crestas, se aprecian los pliegues musculares con enriquecimientos de AChR, la lámina basal sináptica y las células de Schwann terminales (tSC). Modificada de Li, Xiong y Mei (2018).

Actividad de la unión neuromuscular

La actividad neuromuscular se genera a partir de un potencial eléctrico, llevado por la despolarización del axón de la MN, que provoca, por incremento del calcio intracelular, la liberación de moléculas de acetilcolina (ACh) hacia el espacio sináptico y área postsináptica, donde los AChR de los miotubos son activados, modifican su configuración y permiten la entrada de sodio y la salida de potasio, lo que despolariza a la célula muscular y libera calcio del retículo endoplasmático que activa la maquinaria de contracción ligada a actina y miosina (Li, Xiong y Mei, 2018). La fisiología de la contracción muscular no se abordará en profundidad en este trabajo.

Planteamiento del problema

Las MNs son células que forman sinapsis con células musculares. Previamente se demostró que las MNs derivadas de mESC con expresión constitutiva de un transgén de GDNF humano, son electrofisiológicamente más maduras (Cortés et al., 2016), sin embargo, aún no sabemos si estas motoneuronas pueden formar más uniones neuromusculares que las MNs derivadas de mESC sin la expresión constitutiva de GDNF.

Hipótesis

- La estimulación constitutiva con GDNF sobre las motoneuronas favorecerá el establecimiento de la unión neuromuscular.

Objetivo General

- Estudiar el papel del GDNF sobre el crecimiento axonal de neuronas motoras y la formación de la placa neuromuscular

Objetivos particulares

- Diferenciar mESC-control y mESC-GDNF a MNs y observar la expresión de GFP.
- Realizar el co-cultivo de MNs diferenciadas de mESC con miotubos. Co-cultivar en un sistema de microfluidos, las MN-GDNF y los miotubos.
- Estudiar las interacciones de miotubos y MNs, diferenciadas de mESC que expresan o no GDNF humano, de forma constitutiva.

Métodos

Generación de las mESC-control y mESC-GDNF

Las células mESC-control y mESC-GDNF utilizadas se generaron previamente por Cortés y colaboradores (2016). Transdujeron la línea de mESC R1 con un vector lentiviral, incluyendo o no, la región codificante para GDNF humano (Figura 6A) y, posteriormente les introdujeron un vector con la secuencia de la eGFP bajo el promotor de MNs post-mitóticas HB9 (Figura 6B); la línea con expresión de GDNF humano la denominaron como mESC-GDNF y, aquellas sin expresión de GDNF humano como mESC-control.

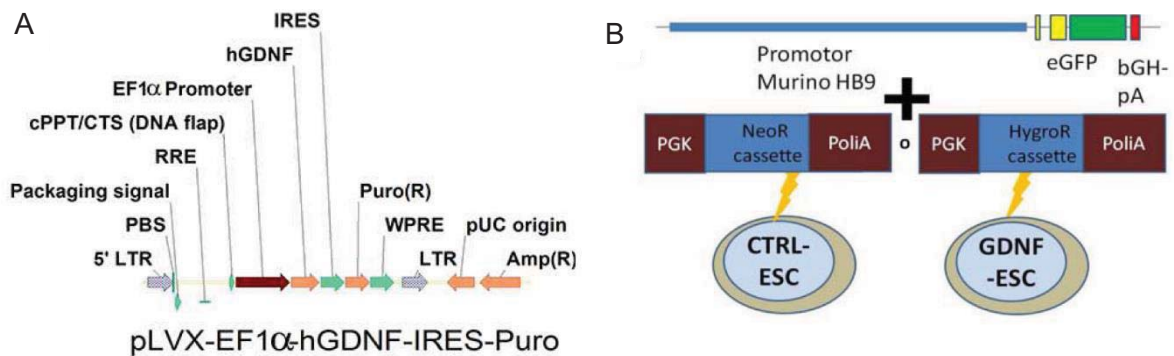


Figura 6 Vectores introducidos en línea mESC R1, para la expresión constitutiva de GDNF humano y la expresión de eGFP bajo el promotor de MNs post-mitóticas HB9. **A)** Vector lentiviral con la secuencia de hGDNF que se transdujo con o sin la secuencia de hGDNF. El vector Control confiere resistencia a neomicina, mientras que la que contiene GDNF posee resistencia de higromicina. **B)** Las líneas Control o GDNF se electroporaron con la construcción reportera, para la expresión de la eGFP bajo la activación del promotor de HB9, para seleccionar clones mESC-Control y mESC-GDNF.

Cultivo de mESC

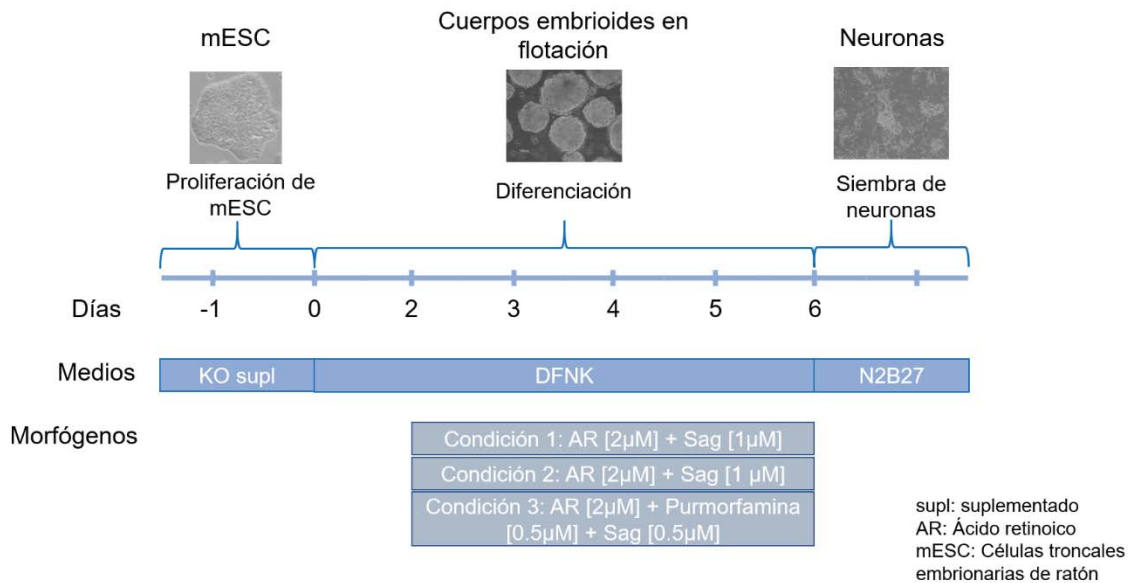
Las mESC-Control y -GDNF se sembraron en cajas tratadas para cultivo e incubadas previamente con gelatina al 0.1% por un mínimo de 15 minutos. Se mantuvieron en medio KO-suplementado, compuesto por KnockOut DMEM (Gibco, 10829018), suero fetal bovino al 15% (Biowest, S1650), aminoácidos no esenciales al 1% (Gibco, 11140076), glutamax [2 mM] (Gibco, 35050061), 2-mercaptoetanol [55 µM] y 50 UI/ml penicilina-estreptomicina. Durante la expansión se mantuvieron con LIF [1000 U/ml], CHIR 99021 [3 µM] y PD 03925901 [1 µM]. Un día antes de comenzar la diferenciación, se mantuvieron en el mismo medio, adicionando solamente LIF (ver Esquema 1).

Formación de cuerpos embrioides (EB), diferenciación y siembra de motoneuronas

Para la formación de EBs y diferenciación hacia MNs nos basamos en el trabajo de Wichterle y colaboradores (2002). Los cultivos de mESC se disociaron con TryPLE Express. Una vez inactivado el TryPLE Express (Gibco 12604021) por volumen, con medio KO-suplementado; se centrifugó el pellet celular y se resuspendió en medio DFNK (DMEM:F12, Biowest; Neurobasal, Gibco, 21103049; reemplazo de suero Knockout al 10%, Gibco, 10828028; glutamax [0.5mM], Gibco, 35050061; 2-mercaptoetanol [35 µM] y penicilina-estreptomicina [50 UI/mL]); se contaron las células y se depositaron en cajas petri no adherentes, con medio DFNK. A partir del

día 2, en condiciones no adherentes, el medio DFNK se suplementó con ácido retinoico [2 μ M] y con diferentes agonistas de *Sonic hedgehog* (Shh), solos o combinados: 1) purmorfamina [1 μ M], 2) SAG [1 μ M], o 3) purmorfamina [0.5 μ M] + SAG [0.5 μ M] (Esquema 1).

Al día 6 de diferenciación, los EBs se disgregaron con TrypLE Express, se sembraron en medio N2B27 o medio para MNs (DMEM:F12, Neurobasal, Remplazo



Esquema 1. Diferenciación de células embrionarias de ratón a MNs. Representación simplificada del proceso de diferenciación de mESC a MNs, utilizando ácido retinoico (AR) [2 μ M], más dos activadores de la vía de Shh, purmorfamina y SAG, empleados por separado o juntos.

de Suero Knockout, glutamax, 2-mercaptoetanol) en los superficies previamente tratadas con PLO/Fibronectina/Laminina (PLO/Fn/Lm).

Síntesis de cDNA a partir de RNA total de mESC y qPCR

Se obtuvo RNA total por el método de trizol (Invitrogen), con cocientes A260/A280 entre 1.86 y 1.93. Después de tratar las muestras con DNAsa (Promega), se procesaron con el protocolo de *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), para generar el cDNA. Para corroborar la integridad del RNA total, antes de la retrotranscripción se corrió una electroforesis en agarosa al 2 %, con un marcador de 1 kb (Promega) (Ver apéndice 2).

Inmunofluorescencia

Para realizar las inmunotinciones, los cultivos con MNs con 3 de subcultivo, se lavaron una vez con PBS, se fijaron con PFA al 4% durante 10-20 minutos y luego se lavaron con PBS o PBS/Albúmina al 0.1%, tres veces, por 5 minutos. Una vez fijadas las células, se permeabilizaron y bloquearon al mismo tiempo, con la solución de bloqueo, preparada con suero normal de cabra al 10%, en PBS/Tritón X-100 al 0.3%, de 45 a 60 minutos. Los anticuerpos primarios se dejaron incubando toda la noche en la solución de bloqueo. Las células se lavaron tres veces para luego incubarse con los anticuerpos secundarios por 1 h en la misma solución. Se lavaron 3 veces y fueron incubadas con Hoechst para teñir los núcleos. Para la marca de ChAT, un día después de la incubación con el anticuerpo primario, se incubó con un anticuerpo biotinilado anti-goat por 1 h y luego con el anticuerpo avidina-Texas Red por 2 h más. Los anticuerpos primarios se usaron a las siguientes diluciones: Oct3/4, 1:200 (B&D 611202); Sox2, 1:500 (Abcam 97959); Nanog, 1:750 (Preprotech 500-P236); Hb9 1:50 (Santa Cruz SC22542); ChAT 1:100 (Chemicon AB144P); GFP 1:500 (Invitrogen A11122), Isl (*developmental studies and hybridoma bank 40.3A4-5 y 40.2D6*). Los anticuerpos secundarios *Alexa Fluor* fueron utilizados a diluciones 1:1000.

Cultivo y diferenciación de los MB C2C12

Los MBs se cultivaron en cajas tratadas para cultivo, con matrigel formulación estándar (0.09 mg/ml), en medio de proliferación (DMEM alto en glucosa y suplementado con 20% de suero fetal bovino (Biowest). Para inducir la diferenciación, se retiró el medio de proliferación, y se reemplazó con medio de diferenciación compuesto de medio DMEM alto en glucosa, suplementado con 2% de suero de caballo (Biowest) e insulina [1 μ M] (añadida al medio con no más de 24 horas antes de su uso).

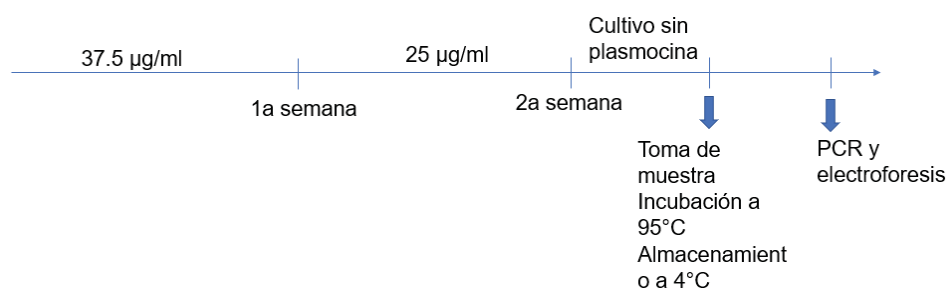
Identificación de micoplasma en cultivos celulares

La contaminación por micoplasma puede ocasionar que los cultivos crezcan de forma lenta o que las células mueran, por lo que se debe monitorear su presencia. La detección de micoplasma se realizó conforme a las indicaciones del *kit Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based* (Sigma, MP0025). Las muestras se obtuvieron de medios de cultivos que alcanzaron una alta confluencia, en ausencia de antibióticos. Las muestras (100 μ l) se incubaron a 95°C por 5 minutos y se

almacenaron a 4°C hasta su análisis, por un tiempo no mayor a 1 semana. Antes de comenzar la PCR, se centrifugaron las muestras por 5 segundos y se tomaron 2 µl de cada muestra para trasladarlos a tubos para PCR con el *master mix* que indica el kit. El programa de la PCR fue el siguiente: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55 °C por 1 minutos, 72°C por 30 segundos, y por último el almacenamiento de la muestra a 4°C. Las reacciones se visualizaron con *Gel/Red* y 2 µL del amplificado de cada una. Se utilizaron geles de agarosa al 2% y las bandas se observaron en el fotodocumentador EC3 *Imaging System from UVP*.

Tratamiento de líneas celulares infectadas con micoplasma

Las células con resultado positivo para la prueba de micoplasma se trataron dos semanas con concentraciones de plasmocina (Invivogen™) dentro del rango recomendado por el fabricante; en la primera semana se utilizó la concentración de 37.5 µg/ml, y durante la segunda de 25 µg/ml (Esquema 2).



Esquema 2. Tratamiento para eliminar la infección de micoplasma de las líneas celulares.

Preparación de la Cámara de crecimiento axonal para el co-cultivo de motoneuronas y mioblastos C2C12

Cinco días antes del pase de las MNs a las cámaras de crecimiento axonal (CCA) (día -5 en el Esquema 3), se comenzó a acondicionarlas: por cada experimento, se dejó una caja de fondo de vidrio con PBS/PLO; al día siguiente (día -4) se lavaron las CCA con alcohol, se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar y luego se esterilizaron con UV (por 10 minutos). A continuación, se retiró el PBS/PLO de las cajas, se lavó tres veces con PBS y a cada una de éstas se le adhirió por presión una CCA. Por último, se adicionaron sustratos de adhesión: matrigel formulación estándar (0.09 mg/ml) en el canal donde se sembrarían los MB y PBS/donde se sembrarían las MN.

Cámaras de microfluidos

Las cámaras de microfluidos adaptadas para el crecimiento axonal (CCA), se colocan sobre una superficie de vidrio y tienen como principal ventaja separar, en cultivo, los axones de somas neurales, permitiendo estudiar eventos moleculares que ocurren en diferentes compartimentos celulares: terminales axonales o somas. Como ejemplo de esto, se puede estudiar el efecto inducido por un quimioatrayente o una neurotoxina en botones presinápticos o dendritas. Otra ventaja de estos dispositivos, y por la que se denominan “de microfluidos”, es la posibilidad de imponer un gradiente de presión hidrostática que permite manipular el flujo de moléculas solubles, al mantener una diferencia de volumen del medio, entre los compartimentos axonal y somático (Park, Vahidi, Taylor, Rhee, & Jeon, 2006). Para ello, estas tienen dos compartimentos llamados canales principales que permanecen unidos por unos microcanales, de menores dimensiones, por los cuales, en general, solo pueden cruzar las prolongaciones neurales y no los somas (Figura 7).

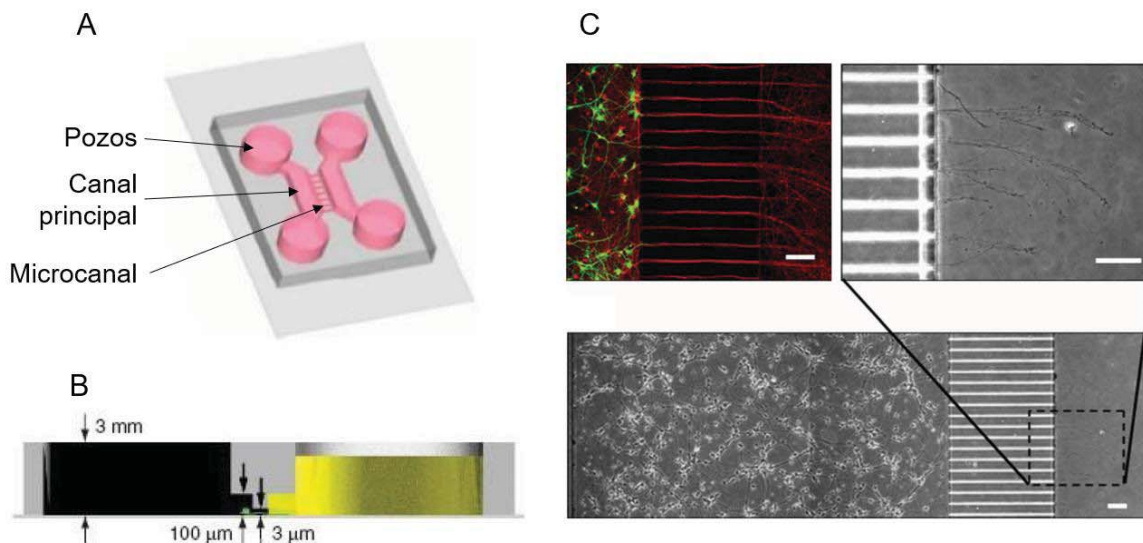


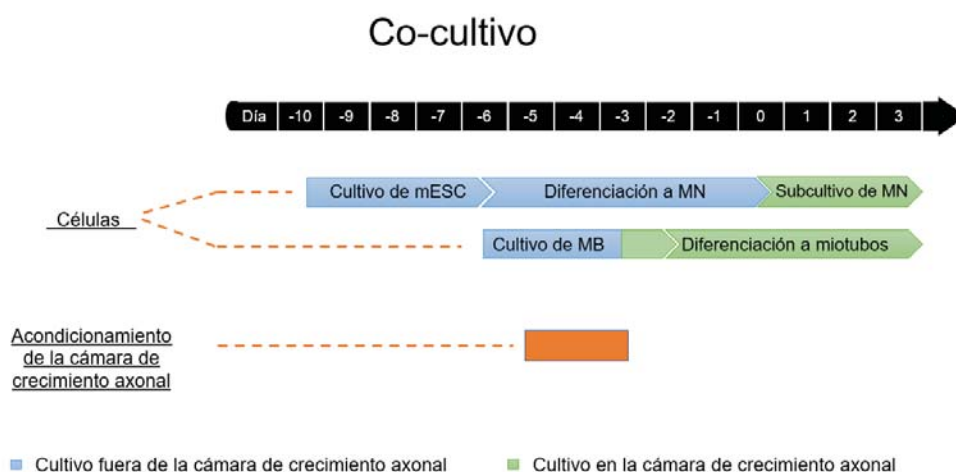
Figura 7. Descripción de una cámara de crecimiento axonal. A) Cámara de crecimiento neuronal sobre un cubreobjetos de vidrio largo. Se muestran en rosa las zonas donde se distribuye el medio de cultivo. *B)* Vista lateral del dispositivo en donde se muestran con distintos colores dos pozos (con 3 mm de altura), dos canales principales (con 100 μm de altura) y 1 microcanal (de 3 μm de altura); además se ejemplifica cómo crear una presión hidrostática para condicionar un flujo de medio del canal principal izquierdo al derecho. *C)* Cultivo de neuronas corticales a los 6 días *in vitro*. Del lado izquierdo se aprecian los cuerpos neuronales y las dendritas marcadas con *Microtubule-associated protein 5* (MAP5) (en verde) que se mantienen en el canal principal, mientras que solo los axones, marcados con Tau (en color rojo) cruzan hasta el segundo canal principal. Escalas = 100 μm . **A y B)** tomadas de Xona™ Microfluidics, C, modificada de Park et al., (2006).

Dispositivos similares también se han utilizado para el co-cultivo de dos poblaciones celulares distintas para asemejar *in vitro* las conexiones neurales con el músculo esquelético (Southam et al., 2013; Zahavi et al., 2015), creando diferentes posibilidades para su estudio fisiológico en un mismo sistema.

Co-cultivo de motoneuronas y mioblastos C2C12 en las cámaras de crecimiento axonal

Al mismo tiempo que se comenzó la diferenciación de las mESC a MNs como se describió anteriormente, los MBs se expandieron independientemente en una caja de 100 mm. Al día -3 del co-cultivo, se depositó por capilaridad la suspensión celular de MB en el compartimento de la CCA tratado con matrigel, mientras que el tratado con PBS/Fn/Lm se dejó con medio para MNs. Después de que los MB proliferaron por un día y alcanzaron una confluencia del 70-100%, se reemplazó el medio de proliferación por el de diferenciación, el cual se renovó diariamente. Al día 0 de co-cultivo, las MNs disociadas de los EBs con TrypLE Express, se depositaron en el compartimento tratado con PBS/Fn/Lm, utilizando medio para MNs junto con inhibidor de Rock Y-27632 [10 μ M] y 10 ng/ml de cada una de las neurotrofinas BDNF, CNTF y NT-3. El cambio de medio de las MNs se realizó diariamente sin incluir al Y-27632.

Una vez sembrados los MB y MNs en la CCA, el medio se cambió diariamente, manteniendo 70 μ L más de medio MB que del medio para MNs.



Esquema 3. Esquema 4 Diagrama general del co-cultivo de MNs y células musculares. Muestra la manipulación de las líneas celulares fuera y dentro de la cámara de crecimiento axonal, en una sucesión de tiempo; además del periodo en el que se prepara la cámara para iniciar el co-cultivo.

Resultados

Cultivo de mESC y análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia

Para conocer las técnicas básicas de cultivo celular y, específicamente las correspondientes a la manipulación de células troncales embrionarias, se utilizó una línea celular que tenemos en el laboratorio, la HBG3. Inicialmente, Wichterle y colaboradores (2002), describieron que el cultivo de las células HBG3 se realiza sobre una monocapa de fibroblastos de ratón (MEF), procedimiento que ha perdurado en los últimos años (Cvetkovic, et al. , 2017; Wu et al., 2011). Aprovechando que se trabajaría con esta línea celular para identificar algunas características básicas de las células pluripotenciales de ratón, se decidió determinar si las HBG3 pueden ser consideradas entre aquellas que pueden mantener sus propiedades pluripotenciales cuando se cultivan sin MEFs, en presencia de dos moléculas conocidas por inhibir la diferenciación y mantener un estado de autorrenovación, CHIR99021 y PD0325901 (2i), inhibidores de la proteína GSK3 β y de MAP cinasas, respectivamente (Mulas et al., 2019; Ying et al., 2008).

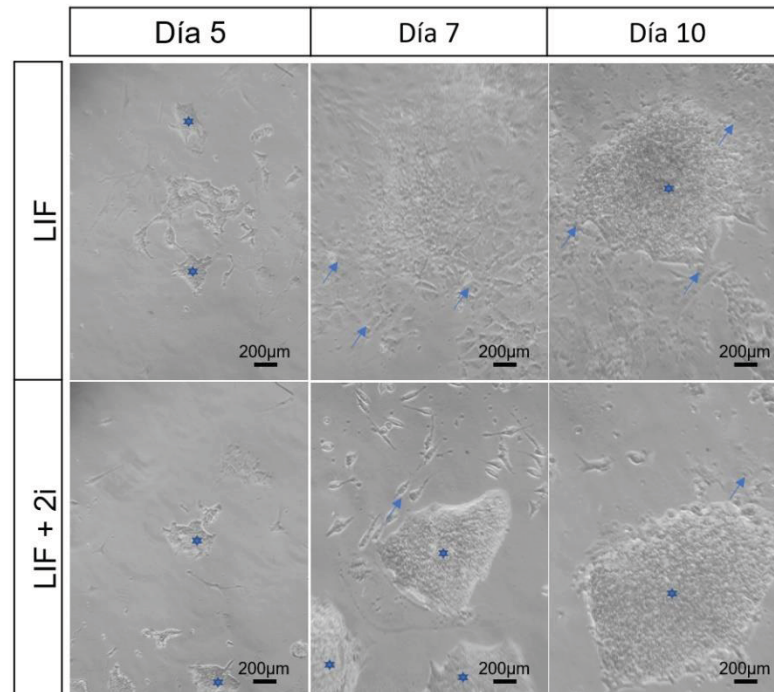


Figura 8. Morfología de las HBG3 durante su proliferación con LIF y LIF + 2i. Hubo colonias de HBG3 (marcadas con una estrella) en ambas condiciones. Sin embargo, aquellas tratadas con LIF+2i tienen un contorno mejor definido, son más compactas y presentan menos células diferenciadas a su alrededor (marcadas por flechas). Escala = 200 μ m.

Se cultivaron las células HBG3 en dos condiciones; en la primera se adicionó solamente LIF y en la segunda LIF con 2i. A los días 7 y 10, las colonias alcanzaron un tamaño que permitió compararlas más fácilmente que en el día 5. Aquellas colonias tratadas con LIF y 2i tienen una morfología mejor definida de colonias pluripotentes, mostraron ser más compactas, en forma de domo y tener menor cantidad de células diferenciadas en su periferia (Figura 8).

Además de comparar su morfología, se buscó la presencia de marcadores de pluripotencia por inmunofluorescencia, tales como los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog (Boyer et al., 2005). Las colonias de las células HBG3, con solo LIF y LIF+2i, tuvieron marca consistente para Sox2, y Oct4, mientras que la expresión de Nanog fue muy tenue (Figura 9). Por otro lado, las células marcadas

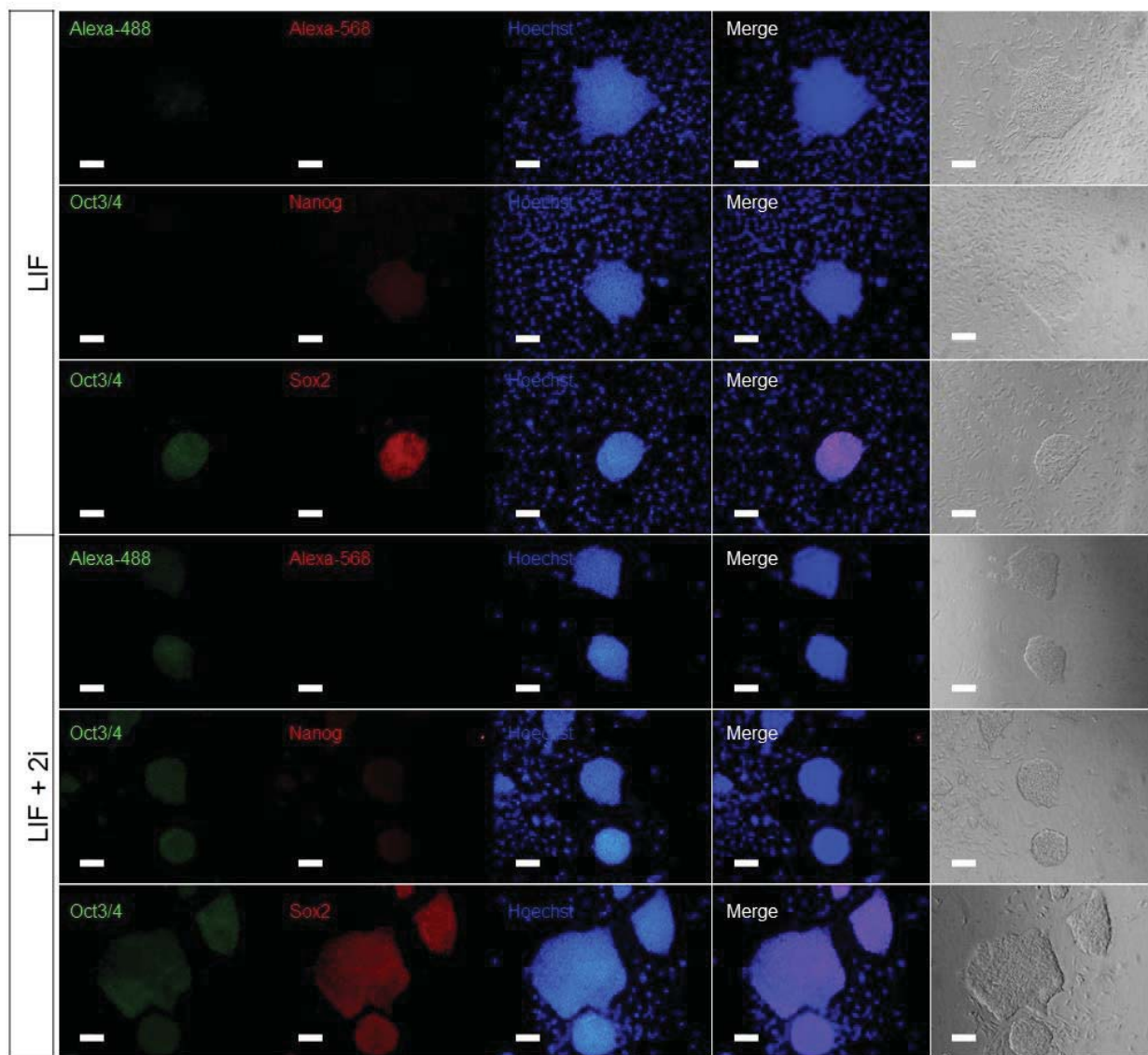


Figura 9. Presencia de los marcadores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog, en cultivos de HBG3, cuando se cultivan en presencia de LIF o LIF + 2i. Escala = 100 μ m.

con Hoechst en la periferia de las colonias fueron negativas para estas marcas de pluripotencia, sugiriendo que tienen cierto grado de diferenciación. Estos resultados muestran que las HBG3 expresan los marcadores de pluripotencia cuando se cultivan en presencia de LIF con o sin 2i. Sin embargo, en ambas condiciones se detectaron fuera de las colonias células negativas para Oct4, Sox2 y Nanog, aunque en menor proporción en la condición con 2i. Lo que sugiere que hay menor diferenciación en esta condición.

Expresión de los mRNA de pluripotencia en células HBG3 cultivadas con o sin 2i

Se buscó evaluar los niveles de expresión de los mensajeros de Oct4, Sox2 y Nanog, para relacionarlos con los resultados obtenidos por inmunofluorescencia. Para esto, se realizó la RT-qPCR al RNA total extraído de las HBG3 cultivadas con LIF ó LIF+2i.

Tomando en cuenta que las muestras derivadas de la primera extracción tenían una mayor cantidad de RNA ribosomal y, que su cDNA amplificaba un gen endógeno, solo se realizó la qPCR de estas muestras (n=1). La cuantificación de mensajero mostró que el nivel de Nanog en aquellas células con LIF+2i fue casi 9 veces mayor que el de aquellas con solamente LIF (Figura 10), aumento que no se puede apreciar en las inmunofluorescencias realizadas para dicho factor (Figura 9). En cuanto a la expresión de Oct4 y Sox2 se observó un decremento de aproximadamente 5 y 2 veces, respectivamente. Tomando en cuenta que el mayor cambio de expresión se registró en el mensajero de Nanog, este cambio podría estar más relacionado con la menor cantidad de células diferenciadas que se observaron, sin embargo, para llegar a una conclusión a este respecto, habría que aumentar el número de réplicas para determinar si estos cambios son o no significativos y si son reproducibles.

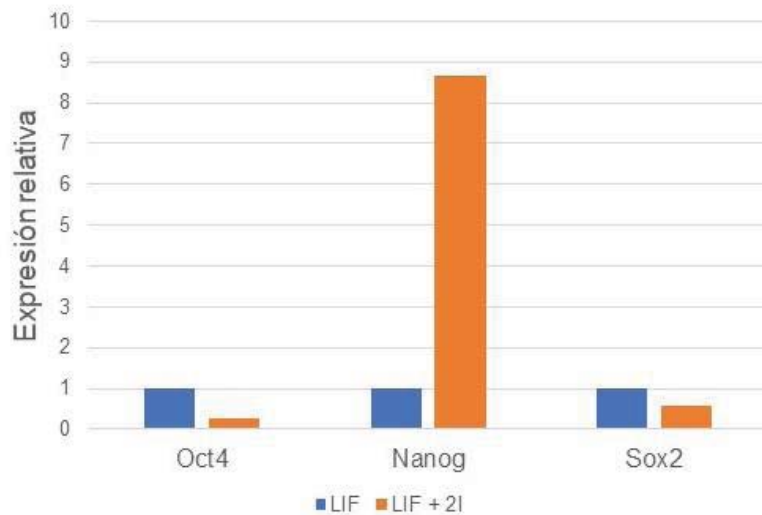


Figura 10. Las células HBG3 tienen una mayor expresión de Nanog y menor de Oct4/Sox2 cuando se incluye 2i a LIF. Expresión relativa de los genes Oct4, Nanog y Sox2 de mESC HBG3 cultivadas con LIF + 2i o solo LIF, normalizando con actina. Hay un aparente incremento en la expresión de Nanog; n=1.

Selección de colonias de células HBG3

Antes de diferenciar las células HBG3 a MNs, se intentó purificar la población capaz de formar colonias con menor número de células diferenciadas. Para esto, se optó por seguir dos métodos diferentes de selección: 1) adherir las células con morfología fibroblastoide a una caja de cultivo sin gelatina por 30 minutos y recuperar las células en el medio, para resembrarlas en cajas tratadas con gelatina al 0.1%; 2) seleccionar mecánicamente con una micropipeta las colonias con menor cantidad de células fibroblastoides alrededor, para resembrarse.

Las colonias seleccionadas mecánicamente presentaron mejor morfología y visualmente, mostraron tener menos células con forma fibroblastoide en la periferia (comparar Figura 11C con 11A y 11B). Por otro lado, aquellas que se intentaron separar por adhesión en plástico, generaron aún más células diferenciadas, o bien, mostraron colonias que se diferenciaron completamente al día 8 de cultivo (Figura 11B). Esto significa que la mejor forma de purificar estas células fue la selección manual de colonias con buena morfología.

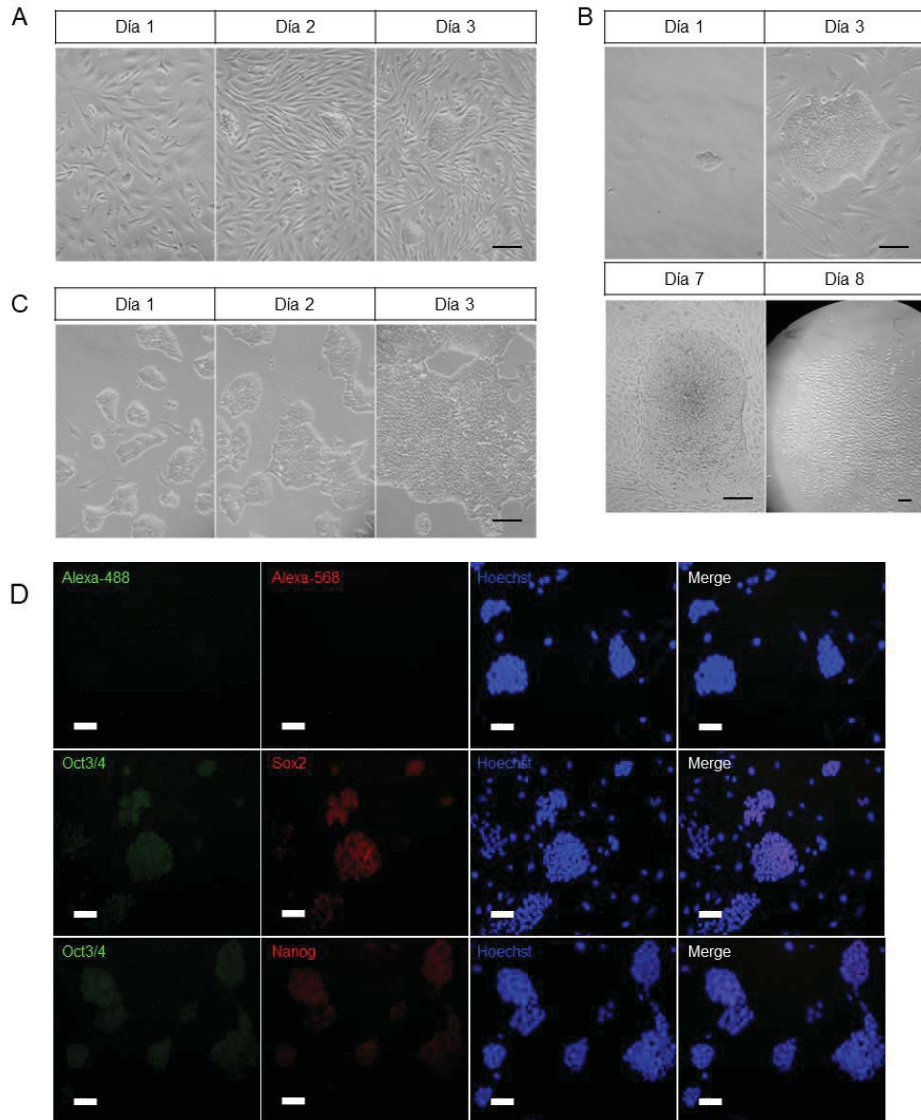


Figura 11 Remoción de las células con forma fibroblastoide en la línea HBG3, antes y después de la selección de colonias. A) colonias con "nicho" (células fibroblastoides alrededor de las colonias). B) Células separadas por adherencia de las células fibroblastoides por media hora y cultivadas en nuevas cajas; al día 7 y 8 estas células generan un nicho de células diferenciadas o las colonias se diferencian en su totalidad. C) mESCs obtenidas por selección mecánica que presentan escasas células fibroblastoides en su periferia. D) Detección por inmunofluorescencia de los marcadores de pluripotencia Oct4, Nanog y Sox2 en las células HBG3, obtenidas a partir de selección mecánica y cultivadas usando LIF+2i. Escala = 100 μ m

Antes de comenzar la diferenciación de las mESC HBG3 seleccionadas mecánicamente se evaluó por inmunofluorescencia la presencia de los marcadores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog (Figura 11D). Las marcas en las colonias fueron similares a las obtenidas en colonias sin seleccionar (Figura 9), sin embargo, se observaron menos células con morfología fibroblastoide (Figura 11C y Figura 9). Estas células se utilizaron para los experimentos de diferenciación a MNs.

Diferenciación de mESC HBG3 a MNs

Para realizar la diferenciación de mESC a MNs, se utilizó la línea celular HBG3 con expresión reportera de GFP en MNs (Wichterle, et al. 2002). Se realizó la diferenciación de estas células con purmorfamina 1 μM , como agonista de Shh. Sin embargo, la marca de células GFP fue baja, por lo que se decidió utilizar otro agonista que aumentara la eficiencia de la diferenciación (Figura 12A).

A continuación, se evaluó otro agonista de Shh a la misma concentración, SAG. El empleo de SAG solo o en combinación con purmorfamina aumentó la proporción de las MNs positivas a GFP en los EBs entre el día 5 y 6 de la diferenciación (Figura 12B). La diferencia en el efecto, sobre la diferenciación de las MNs observadas, puede deberse a la concentración efectiva 50 para activar la vía de SHH; $EC_{50\text{SAG}} = 3 \text{ nM}$ (Chen, Taipale, Young, Maiti, & Beachy, 2002) y $EC_{50\text{purmorfamina}} = 1 \mu\text{M}$ (Sinha & Chen, 2006).

En un principio, se subcultivaron las MNs sobre superficies tratadas con PLO y fibronectina, pero la adhesión fue escasa (Figura 12, columna de la derecha), por lo que en siguientes ocasiones se utilizó además laminina, observando la adhesión de las células (Figura 12C). También observamos que al día 2 la marca de la GFP disminuía con respecto al día 1 para todas las condiciones. Como más tarde se mostrará, esta disminución de GFP se debió a la degeneración de las motoneuronas.

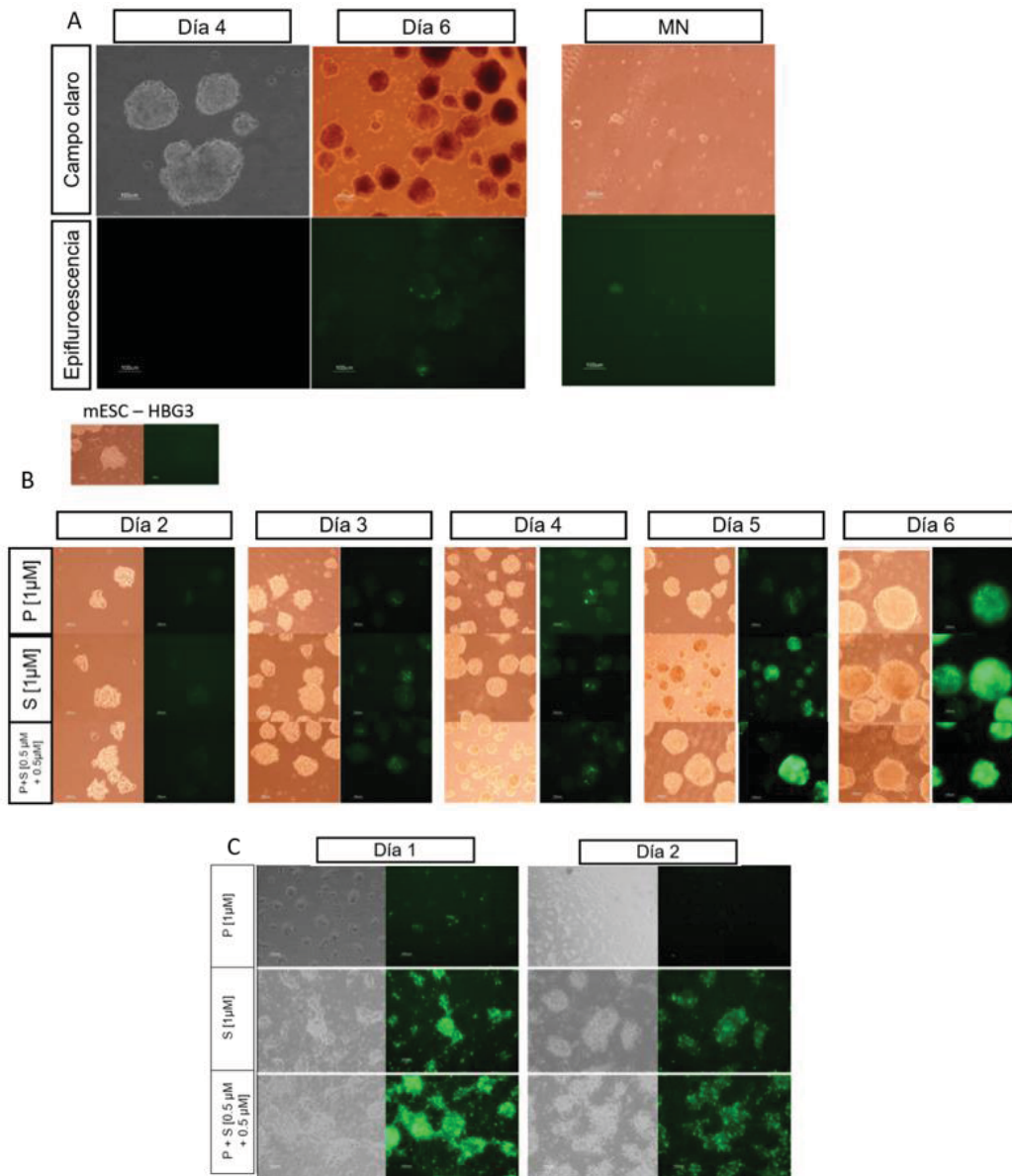


Figura 12. Diferenciación de las mESC HBG3, estimulada por AR y diferentes agonistas de la vía de SHH, y siembra de las MNs. **A)** Fotografías de campo claro y epifluorescencia para evidenciar células GFP positivas durante la diferenciación de las mESC HBG3 con AR [2 μ M] y purmorfamina [1 μ M], a los 4 y 6 días; se muestran células disociadas y sembradas sobre pozos tratadas con PLO y Fn. **B)** Diferenciación de las mESC HBG3, empleando AR [2 μ M] y diferentes agonistas de la vía de Shh por separado o juntos. **C)** Subcultivo de MNs sembradas 1 y 2 días después del término de la diferenciación. P: Purmorfamina; S: Sag. Escala = 100 μ m.

Diferenciación de las mESC Control y mESC GDNF

Después de detectar y tratar el micoplasma en las líneas de mESC control y GDNF (ver métodos y Apéndice 2), las líneas se genotipificaron para los transcritos de la eGFP y GDNF humano. Ambas mostraron tener el transcrito de la proteína verde fluorescente, y solo las mESC GDNF tuvieron una banda de aproximadamente 201 pares de bases, correspondiente a GDNF humano (Figura 13).

Las MNs obtenidas con la diferenciación de las mESC control y mESC GDNF, se detectaron por la expresión de la GFP bajo el promotor HB9, a partir de los días 4-5 (Figura 12B), lo que concuerda a lo reportado por Wichterle y colaboradores (2002).

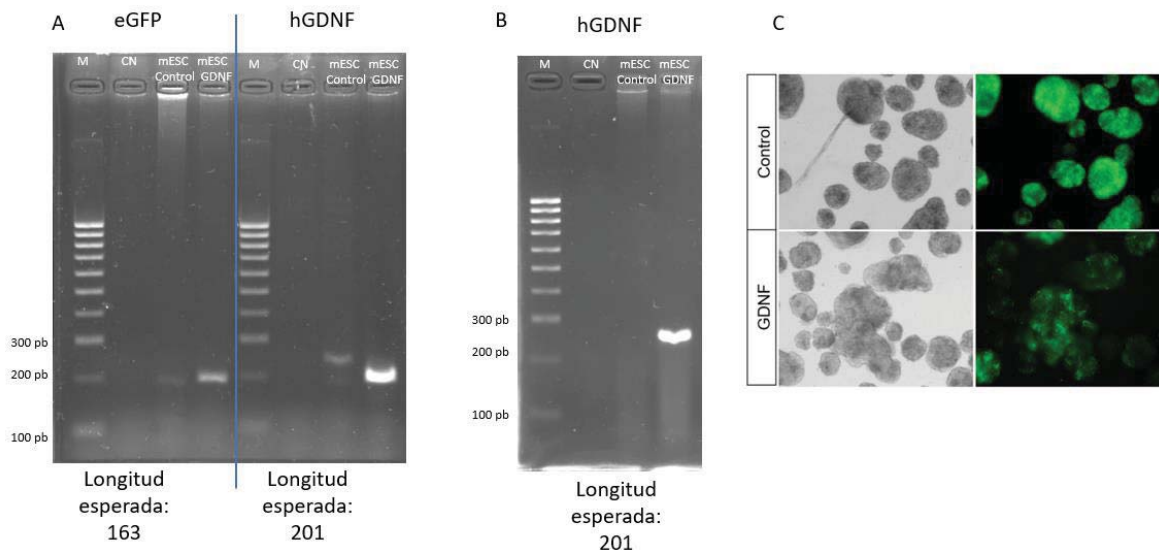


Figura 13. Genotipificación y diferenciación de las mESC Control y GDNF a MNs. A) Genotipificación de eGFP y hGDNF, en mESC control y GDNF. **B)** Segunda genotipificación de hGDNF en mESC control y GDNF, para corroborar que el cDNA del GDNF humano solo está presente en las mESC GDNF. **C)** Fotografías de campo claro y de epifluorescencia de los EBs del día 6 de la diferenciación. La expresión de GFP, bajo el promotor HB9, evidencia a las MNs resultado de la diferenciación con ácido retinoico [2 μ M] y sag1 [1 μ M] a partir de mESC sin y con la expresión constitutiva de GDNF. Escala = 100 μ m.

Luego de que la diferenciación de las líneas mESC control y GDNF ocurriera de manera eficiente, nos preguntamos cuánto tiempo podrían sobrevivir las MNs sembradas, para conocer si serían viables en co-cultivos de 5 o más días, tiempo en el que se ha estudiado la unión neuromuscular (NMJ) en el co-cultivo de MNs de tejido primario y células musculares (Zahavi et al., 2015). Para esto, solo se monitoreó la apariencia de las MNs control sin haber disgregado los EBs, en presencia de las neurotrofinas GDNF, BDNF, NT-3 y CNTF. Entre los días 2 y 3, se encontraron MNs con prolongaciones completas y definidas. Conforme transcurrieron los días, la marca de la GFP de las neuritas se perdió y

posteriormente también la de los somas, indicando la posible degeneración de las MNs. Aunque todavía en el día 10 se encontraron escasos campos de células GFP

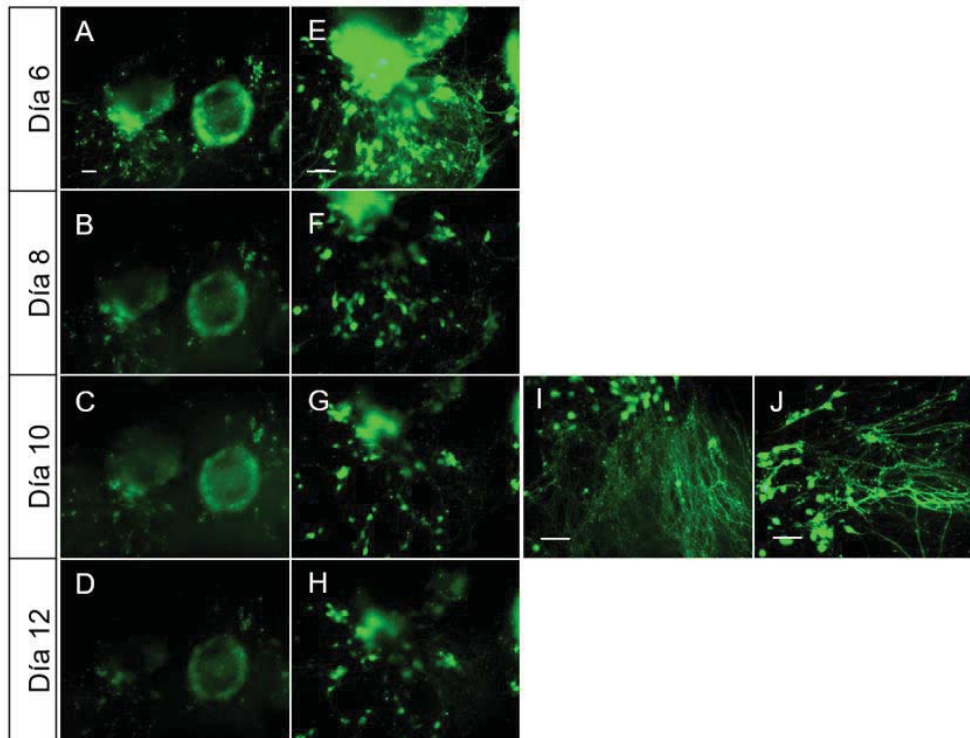


Figura 14. Pérdida de la morfología de las MN Control. Subcultivo de MNs derivadas de mESC Control con 6, 8, 10 y 12 días en cultivo. **A – D**), seguimiento del mismo campo del cultivo de MNs GFP-positivas; un segundo campo muestra los mismos días (E-H). **I y J** muestran un campo diferente, en el que se aprecian somas y procesos neurales intactos a los 10 días. Escala, 100 μ m.

positivas con procesos neurales, prolongar el cultivo de las MNs implica una reducción en las células positivas a GFP con morfología neuronal (Figura 14). Con esto en mente, se planteó estudiar a las MNs en los futuros co-cultivos con MBs, cuando estas tuvieran entre 2 a 4 días de haber sido sembradas.

Para caracterizar a las MNs, se marcaron los subcultivos con anticuerpos que reconocen a la β III-Tubulina (designado Tuj1), marcador pan-neuronal que se expresa en neuronas desde un estado inmaduro (Menezes & Luskin, 1994); Isl1, un factor de transcripción necesario para la supervivencia y la especificación de MNs (Zhuang et al., 2013), y *Microtubule Associated Protein 2* (MAP2), marcador de somas y dendritas en neuronas maduras (Dehmelt & Halpain, 2004) y ChAT, marcador de neuronas colinérgicas. Las MNs GFP (cuya expresión está bajo el promotor *HB9*) expresaron el marcador neuronal MAP2 y el factor de transcripción de MNs Isl1 (Figura 15), además de Tuj1 (datos no mostrados).

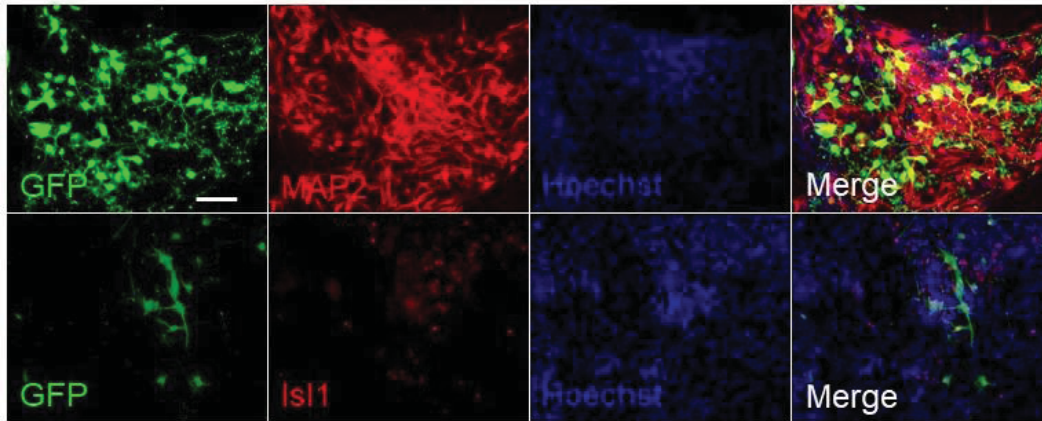


Figura 1. Las MNs son positivas a MAP2 y Isl1. Inmunofluorescencia para los marcadores GFP, MAP2, y Isl1, en MNs GFP-positivas. Escala, 100 μ m.

Cuando se depositaron los EBs con MNs, en el canal de las CCA, estos obstruyeron la entrada del conducto, impidiendo que se dispersaran apropiadamente dentro de este. En consecuencia, antes de resembrar, probamos dos métodos para disgregar los EBs, en el primero utilizamos TrypLE Express y en el segundo, Papaína/DNAsa I. Por ambos métodos se consiguió una mejor dispersión de las células, con la diferencia de que al día 5, los procesos neurales que permanecían en el cultivo de las MNs disociadas con TrypLE se apreciaban claramente por microscopía de epifluorescencia (Figura 16).

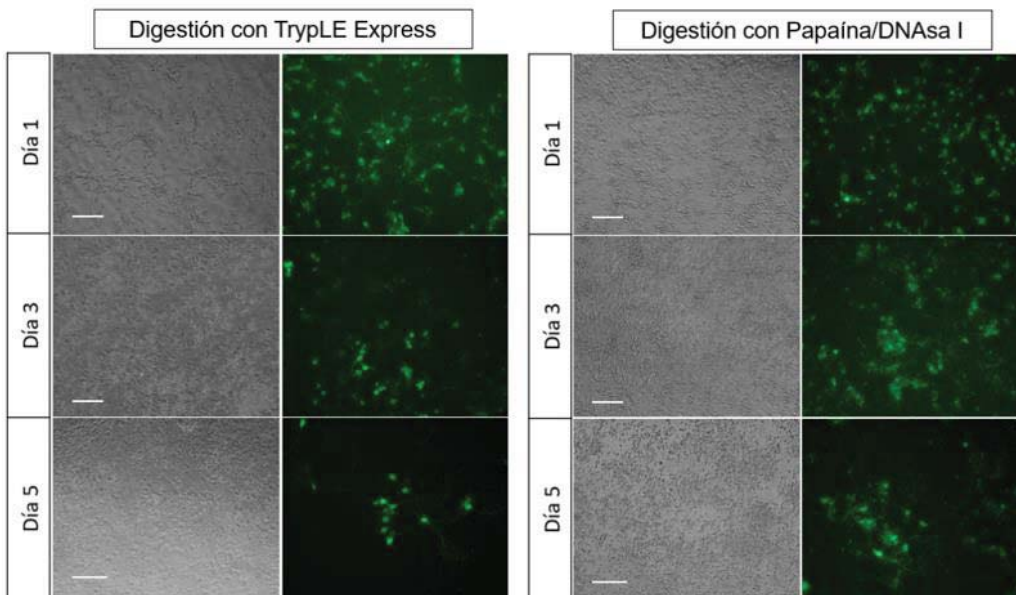


Figura 2. Disgregación de EBs con TrypLE Express o Papaína con DNAsa I. MNs derivadas de mESC GDNF, disgregadas por dos diferentes métodos y subcultivadas por 5 días. Escala = 100 μ m.

Diferenciación de los mioblastos C2C12

La diferenciación de los MB en pozos formó células fusionadas a partir del día 3. En días posteriores, las estructuras tubulares tomaron formas más complejas, como entramados y conformaciones alineadas (Figura 17A). La formación de miotubos se detectó con el marcaje de la cadena pesada de miosina de contracción rápida (Figura 17B). Para los co-cultivos, se utilizaron exclusivamente MB control.

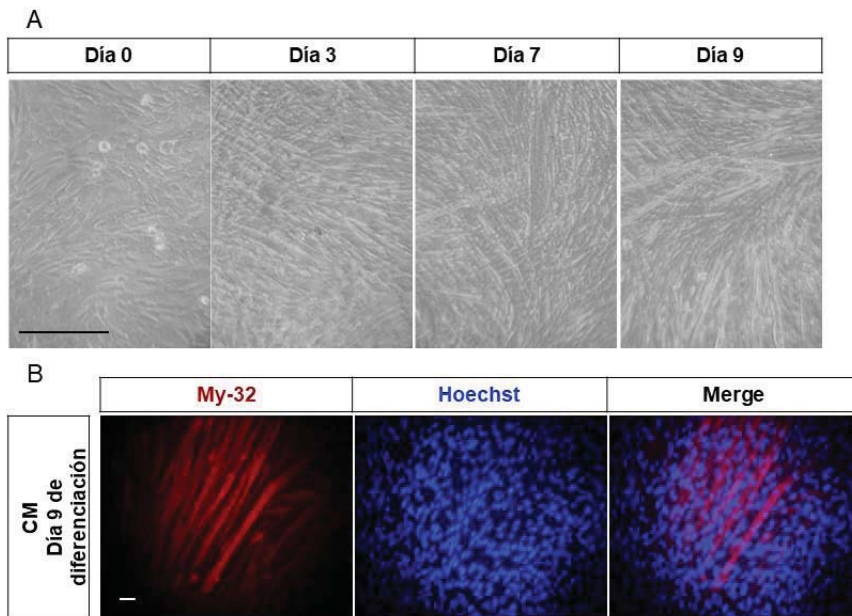


Figura 17. Diferenciación a miotubos a partir de MB C2C12. A) Imágenes de campo claro de los MB Control durante su diferenciación por 9 días con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Insulina. B) Inmunofluorescencia de A al día 9, muestra a la cadena pesada de miosina en rojo y los núcleos en azul. CM: Células musculares. Escala = 100 μm .

Co-cultivo de motoneuronas con MB

Una vez que cultivamos MNs y miotubos por separado, hicimos co-cultivos de ambos tipos celulares. Los intentos iniciales del co-cultivo en las CCA mostraron algunas complicaciones: las neuronas se acumularon en la entrada del canal donde se depositaron las células, ambos tipos celulares no tuvieron una densidad homogénea en el canal, y las células se despegaban durante los cambios de medio. Aún con estos detalles, se encontraron axones cruzando al compartimento de las células musculares desde el día 1, pasando por los microcanales de 150 y 450 μm de longitud (Figura 18).

Los siguientes co-cultivos mostraron que el tiempo óptimo para buscar la unión neuromuscular es el día 3 después de que las MNs han sido sembradas. En este

momento, se observaron miotubos en el compartimiento de MBs que, sugerentemente tienen contacto con los axones de las MNs sembradas en el compartimiento opuesto (Figura 19). Los problemas encontrados en la realización de los siguientes experimentos de co-cultivo y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

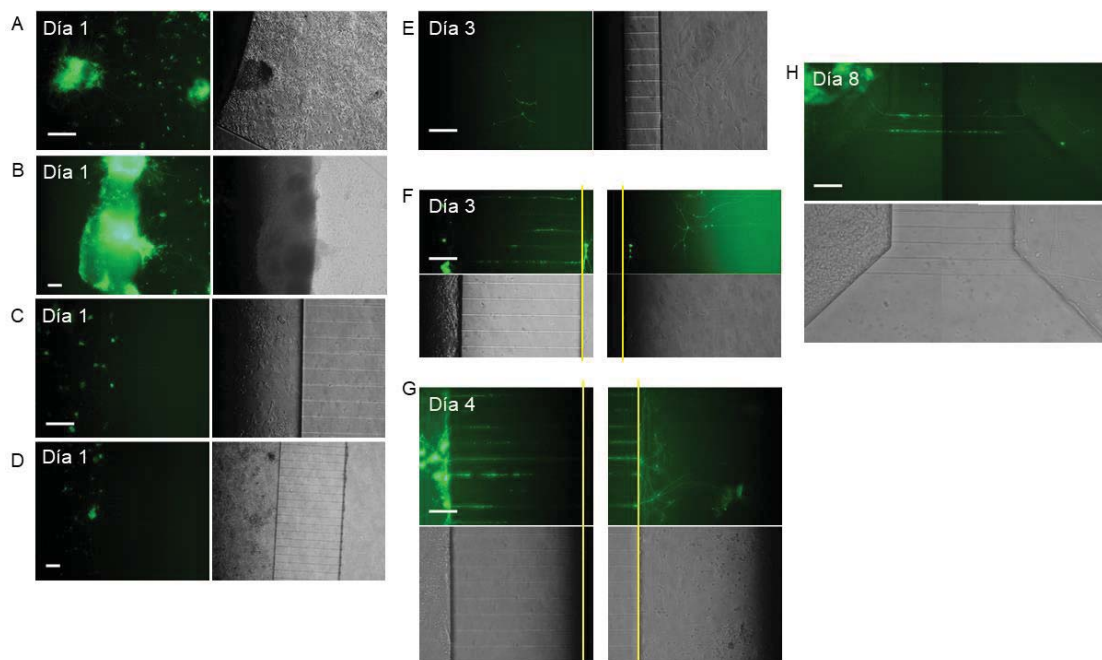


Figura 18. Segundo intento de co-cultivo en CCAs de MNs Control con MB en diferenciación. Imágenes de epifluorescencia y campo claro del co-cultivo de MN-control y MB en diferenciación. A-D) Imágenes del día 1 de co-cultivo en diferentes partes del canal; E-F) día 3 de co-cultivo; G, día 4 de co-cultivo; H, día 8 de co-cultivo. Las líneas amarillas marcan el límite de los microcanales. A-E, G-H) Cámaras con microcanales de 450 µm y F), cámara con microcanales de 150 µm. Escala, 100 µm.

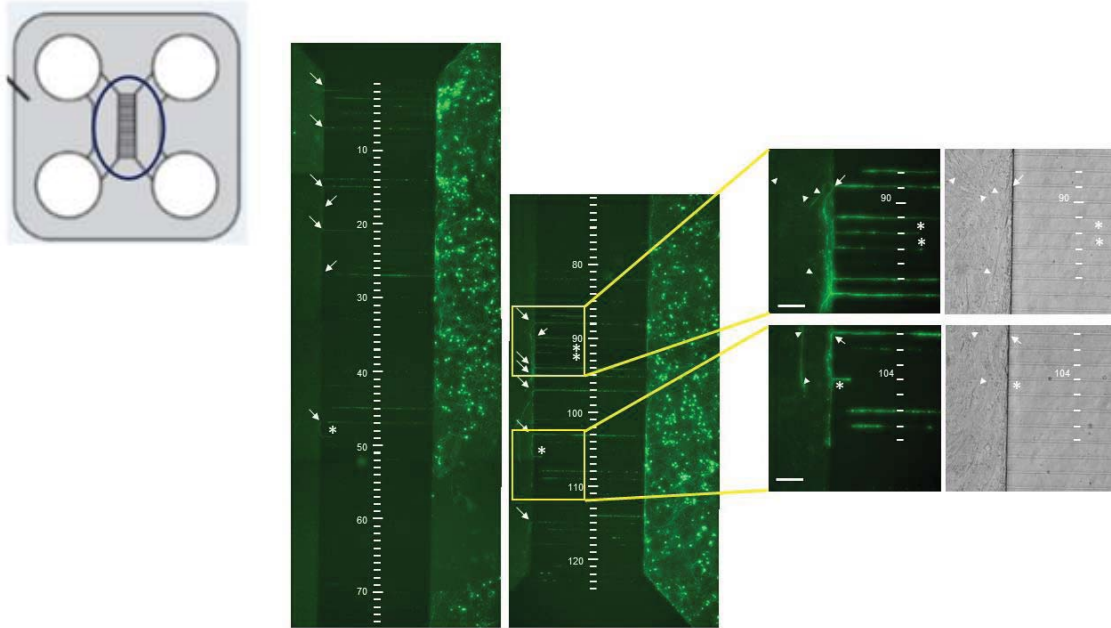


Figura 19. Co-cultivo de MNs Control (lado derecho) de 3 días con MB con 5 días de diferenciación (lado izquierdo). Imágenes de epifluorescencia y campo claro, que muestran todo el rango que abarcan los 124 microcanales de la CCA. En la figura se numeraron los microcanales. Con puntas de flechas se indican los axones que han cruzado al compartimiento de miotubos; con * se marcan axones que entraron en otro microcanal y va de regreso al compartimiento de MNs. A la derecha, las imágenes son aumentos de las zonas encuadradas. Las cabezas de flecha indican posible contacto entre terminales axonales y células musculares. Escala = 100 μ m

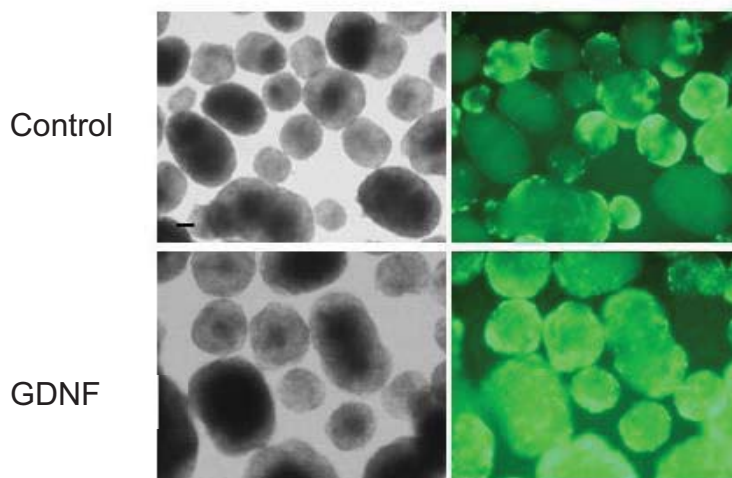


Figura 20. La expresión de GFP aumentó en EBs diferenciados a partir de una densidad celular superior. La expresión de la GFP aumentó en los EBs cuyo inicio en la diferenciación comenzó con una densidad de 5.45×10^4 / cm^2 .

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de co-cultivo.

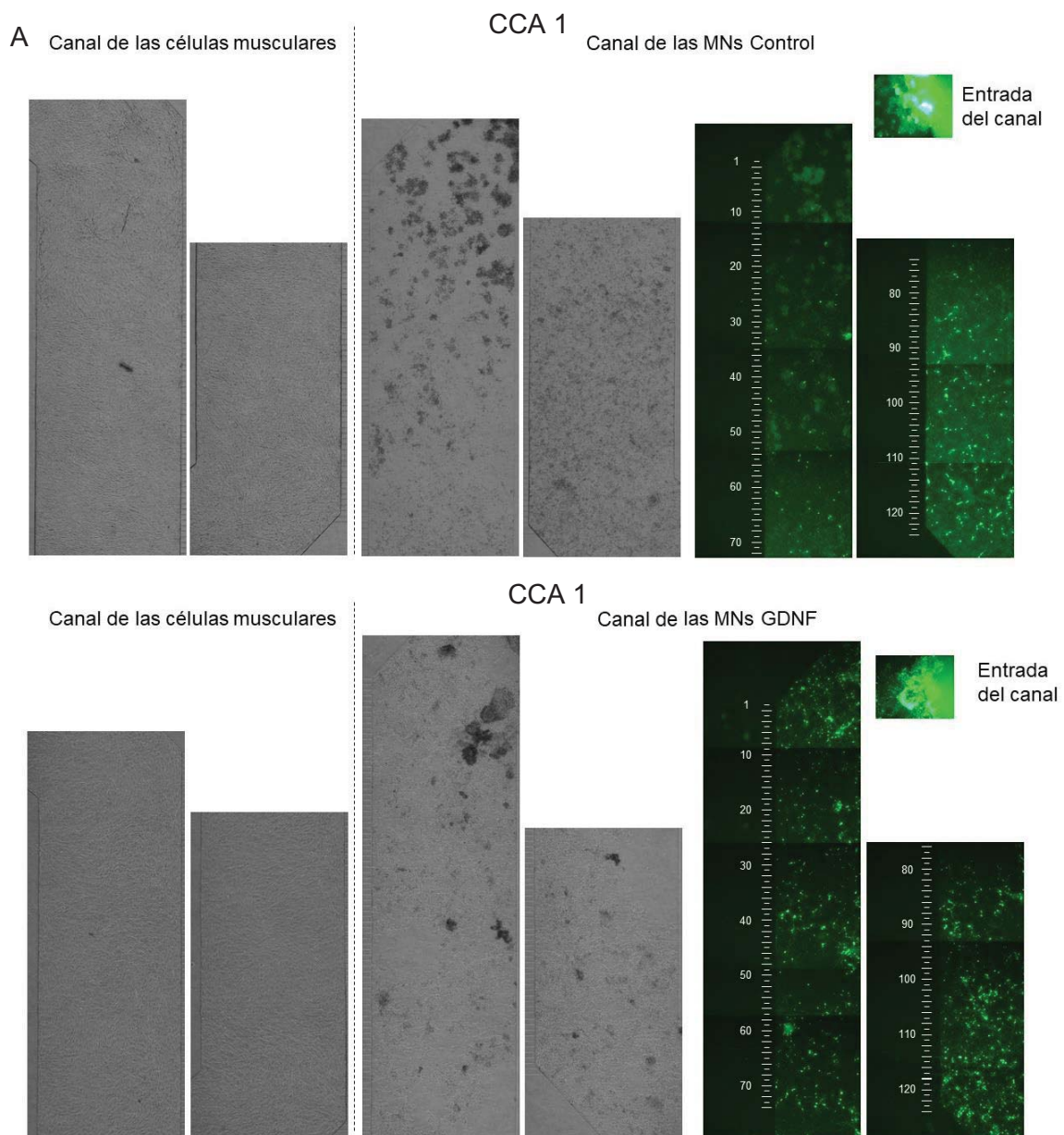
E	Tipos celulares estudiados	Resultado al día 3	Aspectos para mejorar
1	MNs Control con miotubos C2C12	MNs Control: Cruzaron 10 axones.	Contar un par de veces la suspensión celular para calcular mejor la densidad celular a usar
	MNs GDNF con miotubos C2C12	MNs GDNF: Ningún axón cruzó. La densidad de las MNs no fue homogénea.	
2	MNs Control con miotubos C2C12	MNs Control: Cruzaron 0. Las MNs crecieron apartadas de los microcanales.	La adhesión celular. Incrementar la Fn y Lm del lado de las MNs, a 5 µg/mL y 2 µg/mL, respectivamente.
	MNs GDNF con miotubos C2C12	MNs GDNF: Cruzó 1. Las MN crecieron apartadas de los microcanales.	
3	MNs Control con miotubos C2C12	MNs Control: Cruzaron 13 axones.	Aumentar la cantidad de células por suspensión celular.
	MNs GDNF con miotubos C2C12	MNs GDNF: Se degeneraron. La densidad de la MNs GDNF fue menor a las control.	

E: Experimento

Para aumentar la cantidad de células sembradas en los canales, se modificó la cantidad inicial de células para el desarrollo de los EBs, sembrando 3 millones en lugar de 1 por caja Petri de 10 cm no tratada para cultivo. Al término de la diferenciación (día 6) encontramos que los EBs GDNF presentaban una mayor proporción de células fluorescentes (Figura 20).

Una vez realizados los ajustes considerados en la Tabla 1 consistentes en contar de 2 a 3 veces las suspensiones a sembrar, incubar el canal de MNs con 5 µg de Fn y 2 µg de Lm y aumentar la suspensión celular de los EBs disgregados, de 40,000 células/µL a 80,000 células/µL, se consiguió que las células se distribuyeran homogéneamente en los canales, con la aparición de espacios sin células entre los

cúmulos celulares adheridos (Figura 21). Al día 2 y 3, la contabilización de los axones que cruzaron del canal de MNs al de células musculares mostró que solo las MNs GDNF habían cruzado (Figura 22 y Tabla 2; con promedio = 11 y 16 axones que cruzaron los días 2 y 3, respectivamente, mientras que las MNs control tuvieron cero axones cruzando; n=2). En la Figura 22, se muestra una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-GFP, que permitió observar con mayor definición los axones que lograron cruzar hasta las células musculares en las MNs GDNF.



CCA 2

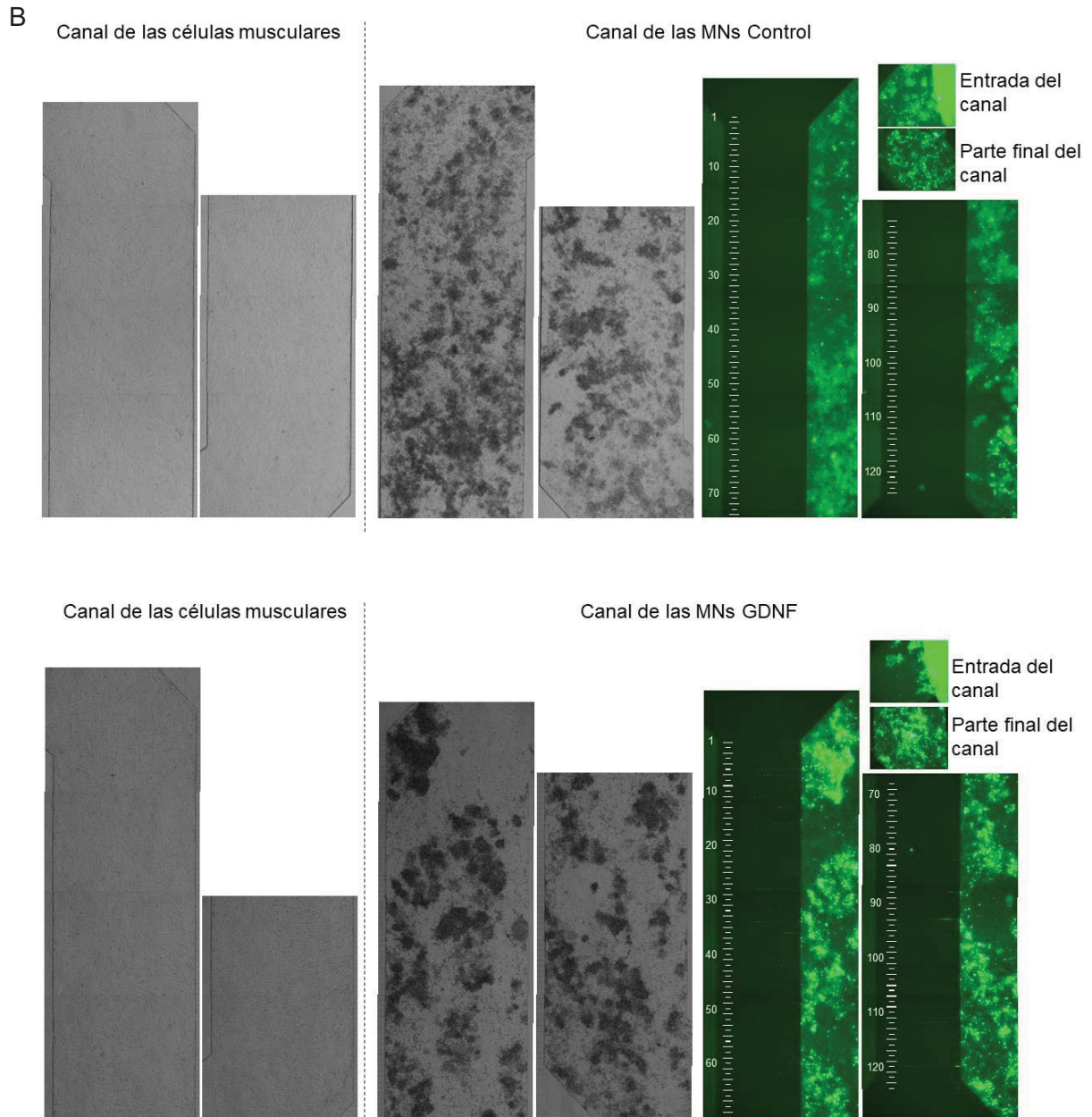


Figura 21. Ejemplos de la distribución celular en co-cultivos al día 1 de sembrar las MNs, en dos lotes diferentes de MNs Control y GDNF. **A y B)** Imágenes representativas de los co-cultivos con MNs Control y GDNF. Se puede apreciar como las MNs se encuentran a lo largo de todo el canal, con una mayor cantidad de marca GFP en aquellas con expresión de GDNF. Se muestran cultivos con MNs diferenciadas en experimentos diferentes.

Tabla 2. Cuantificación de los axones que cruzaron del canal de las MNs al de las células musculares al día 2 y 3

	Exp.	R	Axones que cruzaron					
			d2	d3	Prom. d2 por exp.	Prom. d2, global	Prom. d3, por exp	Prom. d3, global.
MNs Control	1	1	0	0	0	0	0	0
	1	2	0	0				
	2	1	0	0	0	0	0	
	2	2	0	0				
MNs GDNF	1	1	19	22	12	11	15	16
	1	2	6	9				
	2	1	19	31	11	11	17	
	2	2	3	3				

* R-> Réplica; d -> día; prom. -> promedio; exp. -> experimento

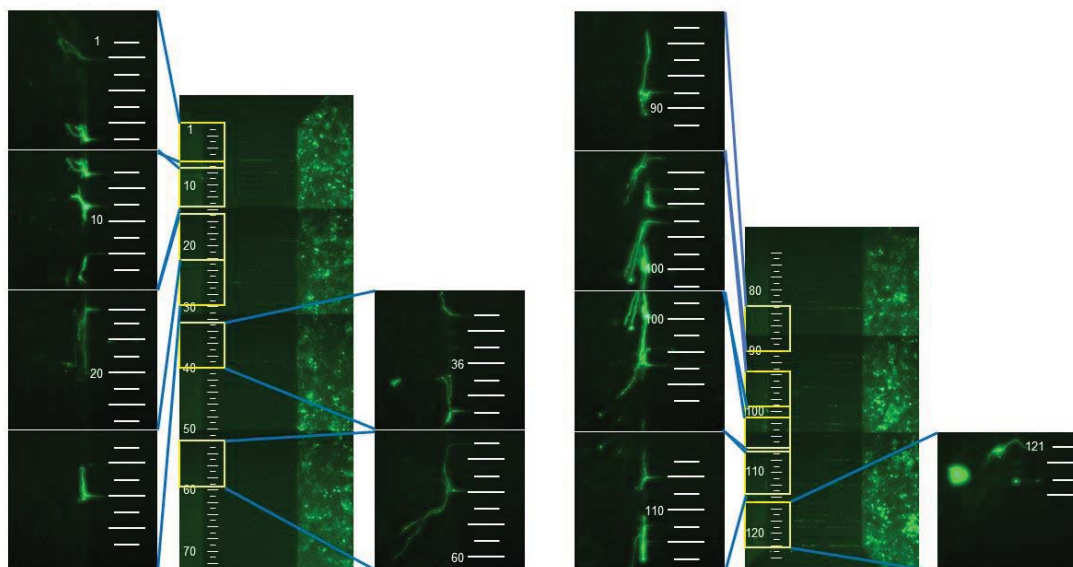


Figura 22. Los axones de las MNs GDNF lograron cruzar al compartimiento de las células musculares al día 3 de co-cultivo. Las células en las CCA se fijaron al día 3 y se agregó anticuerpo anti-GFP para incrementar la señal. Las imágenes que muestran todos los microcanales corresponden a fotos tomadas con células vivas; las fotos de mayor aumento son inmunofluorescencias que acentúan la marca de la GFP. En esta cámara 22 axones pudieron cruzar al compartimiento muscular.

Para localizar las posibles interacciones entre MNs y células musculares, se buscó por microscopía confocal la colocalización de los AChR en el músculo, con axones GFP. En las capturas obtenidas se observó que la mayoría de los axones de las MNs GDNF que cruzaron hacia el canal de las células musculares y están en

contacto con ellas, no colocalizan con marca para α -bungarotoxina (α -BTX), una toxina con gran afinidad por AChRs, lo que sugiere una interacción no asociada a una sinapsis neuromuscular (Figura 23 E-I). Por otro lado, se encontraron, en menor cantidad, axones haciendo contacto con regiones positivas para α -BTX, sugiriendo una NMJ en estos casos (Figura 23 A-D y tabla 3).

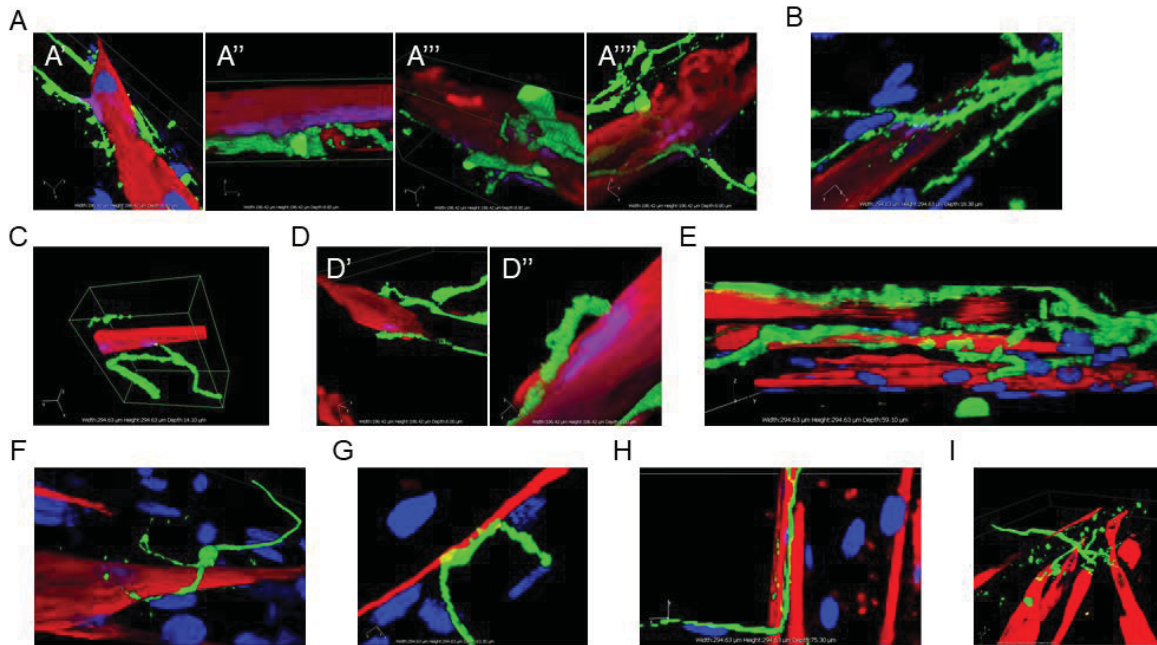


Figura 23. Capturas 3D representativas de interacciones entre las células musculares y MNs GDNF al día 3 de co-cultivo. Acercamientos entre axones de MNs y clusters de AChR. **A)** Unión neuromuscular asociada a la interacción de AChR y los axones de las motoneuronas, **A'**, **A''**, **A'''** muestran la misma interacción en A vista desde un lado, desde abajo y desde arriba, respectivamente. **B**, **C** y **D** son ejemplos adicionales. **A – D)** Los axones se observan en color verde por la expresión y marcaje de la GFP, la miosina con rojo por MY-32, los AChR en magenta por α -BTX, y los núcleos con azul por la tinción con Hoechst. **E-I)** Contacto de axones de MNs GDNF con miotubos, sin aparente asociación con *clusters* de AChR.

Tabla 3 Contactos de marca de α -BTX en miotubos con axones GFP positivos en MNs GDNF.

	Exp.	R.	Cantidad de contactos GFP- α BTX	Posibles contactos *	Contacto con miotubos
MNs GDNF	1	1	1	1	Si
	1	2	1	1	Si
	2	1	0	0	Si
	2	2	2	1	Si

* la marca de α -BTX está próxima a la de GFP, pero no contactan.

Discusión

En el presente estudio pretendíamos sustentar la propuesta de que las HBG3 pueden cultivarse en ausencia de MEFs usando LIF + 2i, como otras líneas celulares (Mulas et al., 2019). Sin embargo, los resultados mostraron que estas células, a pesar de formar colonias con buena morfología (compactas y con borde definido) y expresar los marcadores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog, se diferencian espontáneamente en estas condiciones. También se pudo demostrar que una opción para disminuir la cantidad de células diferenciadas es la selección manual de las colonias, que disminuyó significativamente este problema.

En relación con el aumento en la proporción de MNs obtenidas en la diferenciación al cambiar purmorfamina por otro agonista de la vía de Shh, este resultado ya había sido reportado por Wichterle y Peljto (2008). En su trabajo expresan que el uso de HhAg1.3 (SAG) o la misma proteína Shh, es más eficiente que la purmorfamina. Sin embargo, no se discuten las razones de este resultado. Curiosamente, aunque ambos morfógenos tienen el mismo blanco y se utilizan en la misma concentración, sus efectos son diferentes en la cantidad de células positivas a GFP. Este fenómeno, probablemente está asociado a la mayor afinidad por Smoothed que muestra SAG en comparación con la purmorfamina (Chen et al., 2002; Sinha & Chen, 2006), activando más fuertemente la vía de Shh, que se requiere para la especificación hacia MNs (Johan Ericson et al., 1996).

Un problema al que nos enfrentamos en relación con la adherencia celular nula de las MNs en ausencia de laminina, suponemos que puede deberse a la importancia de las lamininas en el desarrollo, permitiendo la adhesión, así como el crecimiento y la extensión de los procesos neurales del sistema nervioso central (Yu et al., 2008).

Por otro lado, cuando diferenciamos MNs a partir de mESC para los co-cultivos, inesperadamente, detectamos que la línea mESC control produjo más MNs GFP-positivas que las mESC GDNF en el día 6 de diferenciación, como puede apreciarse en la Figura 13C; este resultado se obtuvo cuando la diferenciación celular se inició con 1.8×10^4 células/cm². A diferencia de los resultados del presente estudio, en trabajos previos del laboratorio utilizando purmorfamina, se reportó una mayor diferenciación a MNs en las mESC GDNF, comparadas a las mES control (Cortés et al., 2016). Como una posible explicación, se consideró que el uso de uno u otro agonista de la vía de Shh podría tener interacciones con la señalización de GDNF y que una interacción de esta naturaleza entre la señalización del GDNF con la de SAG, podría disminuir la diferenciación a MNs. Sin embargo, luego de incrementar la cantidad inicial de células para iniciar la diferenciación a 5.5×10^4 células/cm² se observó que había una mayor proporción de neuronas GFP⁺ en los EBs GDNF, con

respecto a los EBs control, tal como se había reportado. Para definir estas posibilidades, en el futuro, podría caracterizarse el aumento de los progenitores de MNs derivados de mESC con expresión constitutiva de GDNF, controlando las variables del uso de purmorfamina o SAG y, la cantidad de células con las se inicia la diferenciación, al mismo tiempo, que se cuantifica la concentración del GDNF en el medio.

Un resultado interesante es que se consiguió hacer el co-cultivo de MNs diferenciadas a partir mESC, con miotubos diferenciados de los MBs. Hasta ahora, parece ser que el momento óptimo para detectar posibles interacciones entre fibras musculares y MNs es el día 3 de co-cultivo, pues en días posteriores, se aprecia la presencia de una degeneración morfológica de los somas y axones en la mayoría de las MNs, como se reportó previamente (Wichterle et al., 2002).

El mantenimiento por 3 días que obtuvimos del co-cultivo entre MNs y miotubos, podría ser suficiente para asemejar y estudiar los procesos celulares (por ejemplo, la extensión axonal bajo moléculas quimioatrayentes y, modulación del citoesqueleto del cono de crecimiento antes y después de alcanzar su blanco) que ocurren en las primeras etapas de la formación de la unión neuromuscular en ratón. Para evaluar etapas posteriores de la unión neuromuscular es necesario ampliar el tiempo de la supervivencia de las MNs, lo cual, podría obtenerse con la adición de forskolina al compartimiento de las MNs (Uzel et al., 2016) pero se debe tomar en cuenta que este fármaco en rana, genera la desensibilización de la NMJ ((Middleton et al., 1986). En cuanto a las células que utilizamos, estas tienen la ventaja de sobreexpresar GDNF, molécula que tiene relevancia en la diferenciación hacia MNs y también en su supervivencia (Cortés et al., 2016; Henderson et al., 1994).

El estudio al día 3 del co-cultivo parece corto y podría enriquecerse si se consiguiera extender el tiempo de supervivencia de las MNs, ya que habría una ventana de tiempo mayor para que más axones crucen e interactúen en el compartimiento de las células musculares. El tiempo que tardan los axones para cruzar no parece ser un factor limitante para la formación de las NMJs, ya que, al menos en pollo, la agrupación de los *clusters* de AChR que forman sinapsis con las MNs pueden formarse al cabo de unas horas de ser inervados (Frank & Fischbach, 1979). Otro aspecto para considerar con este y otros modelos, relacionado al tiempo, es que las uniones neuromusculares a pesar de ser funcionales desde estadios embrionarios tempranos, su maduración continúa aún después del nacimiento.

A pesar, de que la unión neuromuscular *in vitro* se ha estudiado en dispositivos de microfluídos (Park, Liu, McDonald, Thakor, & Yang, 2013; Zahavi et al., 2015), hasta nuestro conocimiento, el presente trabajo es el primero, en incluir MNs diferenciadas a partir de mESC. Además, el utilizar cámaras con microcanales de mayor longitud

(900 μm), asegura que solo los axones sean capaces de cruzar hasta el lado de las células musculares.

El uso de las CCA mostró ser útil para mantener separadas las poblaciones de células musculares y MNs. Sin embargo, siguiendo el protocolo de co-cultivo de este trabajo se observaron que algunas células musculares son capaces de entrar a los microcanales y desplazarse hacia el compartimiento de las MNs. Esto no mostró ser un problema para que los axones crucen los microcanales, pero debe tomarse en cuenta, si en futuros experimentos se extrae RNA o proteína del canal neuronal.

Con este protocolo de co-cultivo y la ayuda de la microscopía confocal encontramos contactos de MNs con células musculares, en los que se observaron zonas con y sin *clusters* de AChR. Aquellos contactos que presentaron marca para MNs, miotubos y AChR sugieren ser uniones neuromusculares. Una demostración más convincente de esta suposición puede obtenerse en estudios en los que se observe que la estimulación de las MNs (por ejemplo, con glutamato), genere contracciones en los miotubos. Se demostraría en esa forma, una NMJ funcional.

Con el protocolo de co-cultivo utilizado, observamos que las MNs GDNF consiguieron alcanzar el otro compartimiento e interactuar con las células musculares, mientras que las MNs control no lo consiguieron. En los axones que cruzaron, se observaron algunas zonas de co-localización de los axones GFP⁺, miosina y AChR, lo que sugiere la formación de NMJ por las MNs GDNF.

Este tipo de modelos, como demostraron (Zahavi et al., 2015), pueden utilizarse para estudiar mediante microscopía, la cinética del transporte axonal retrógrado o anterógrado de biomoléculas -acopladas a un fluoróforo- en MNs. Aunque en ese trabajo únicamente demuestran el desplazamiento retrógrado del GDNF secretado por células musculares e introducido en las MNs, también podrían adaptarse procedimientos similares que permitan examinar el transporte de biomoléculas a lo largo del axón, antes, durante y después de establecer una unión neuromuscular.

Dentro de los puntos a considerar en nuestros resultados del co-cultivo que desarrollamos se encuentran: (1) El mantenimiento del co-cultivo involucra una pequeña ventana de tiempo, (2) las células que se encuentran en el canal de MNs pertenecen a una población heterogénea, y (3) los MBs y otras células en el compartimiento de las MNs continúan proliferando, por lo que se requiere proporcionar cada vez más medio.

Para mejorar este modelo, consideramos que, a futuro, es crucial adicionar elementos que favorezcan la supervivencia de las MNs, por una parte, además de la incorporación en el compartimiento de las células musculares de células terminales de Schwann, para asemejar mejor lo que ocurre *in vivo* en la unión neuromuscular.

Por último, este tipo de sistema también puede ser útil en el futuro para el estudio de opciones terapéuticas para enfermedades neuromusculares, como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Tal es el caso que mostraron Stoklund y colaboradores (2021), en el cual, a partir de un sistema similar al nuestro concluyeron que la adición de un inhibidor de deacetilasas de histonas (HDAC6), Tubastatina A, favorece el crecimiento y rebrote de neuritas, además de la formación de uniones neuromusculares cuando las neuronas presentan una mutación asociada a la ALS.

Conclusión

Desarrollamos un modelo que permite el estudio de uniones neuromusculares, cultivando por separado, motoneuronas diferenciadas de mESC y miotubos. En este sistema, logramos que las motoneuronas derivadas de una línea celular transgénica con la sobreexpresión de GDNF humano, a diferencia de aquellas que no lo expresaron, extendieran sus axones por más de 900 μm , contactaran con las células musculares y, en algunos casos, presentaran contactos que sugieren la formación de uniones neuromusculares. Experimentos *in vivo* o *in vitro* que evalúen la extensión axonal de las motoneuronas, cuando se administra el GDNF sobre sus somas, durante y/o después de su generación, podría brindar un mayor panorama de este efecto del GDNF.

Apéndice 1

Geles para el análisis de las muestras utilizadas en la RT-qPCR

Antes de iniciar la reacción de retrotranscripción, se observó la integridad de las muestras de RNA extraídas de dos cultivos individuales, observando las bandas de las subunidades de RNA ribosomal 18S y 28S, en gel de agarosa, y se comprobó la amplificación de actina a partir de su cDNA (Figura 24A y 24B).

La muestra derivada de la primera extracción mostró claramente las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S (Figura 24A), lo que indica que se consiguió RNA en estado intacto. Sin embargo, no se aprecia que la banda de 28S sea mayor a la 18S, por lo que no es de alta calidad (Schroeder et al., 2006).

Una vez realizada la conversión de RNA mensajero a cDNA, solo el par de las muestras derivadas de la primera extracción amplificaron una banda esperada del gen endógeno *beta-Actina* (230pb), de tamaño entre los 200 y 300 pb (Figura 24B).

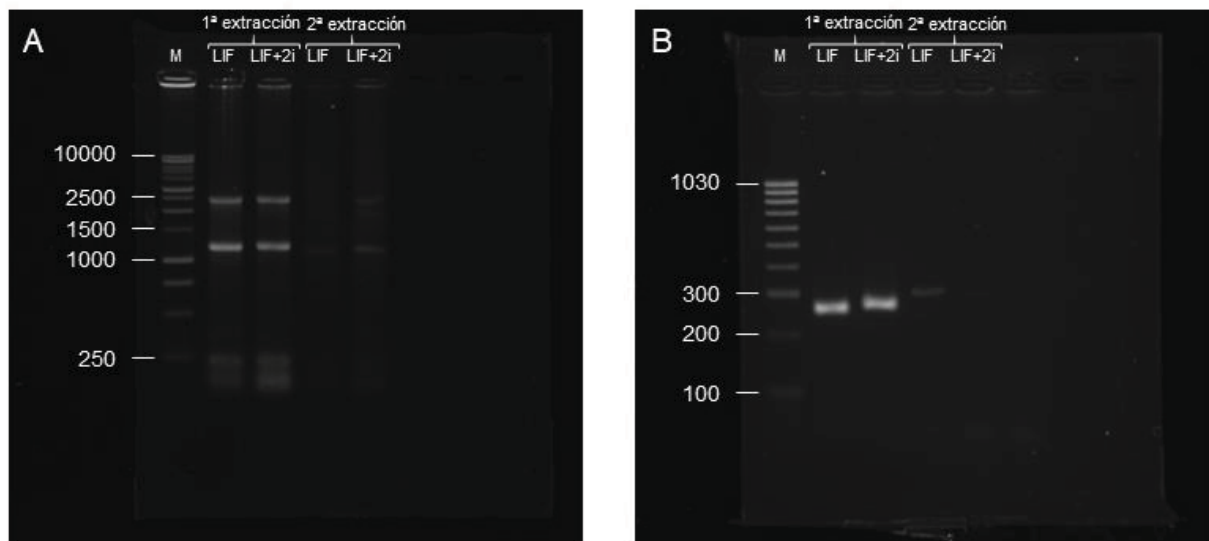


Figura 24. Análisis del RNA obtenido de las mESC HBG3, cultivadas con solo LIF o LIF + 2i. **A)** Integridad del RNA, las primeras dos bandas (2500 – 2000 pb y 1500 – 1000 pb, muestran a las subunidades ribosomales 28S y 18S. **B)** Electroforesis de los amplicones de beta-actina obtenidos de muestras de cDNA generadas a partir de RNA total. El peso esperado de la actina es de 238 pb. En A y B, los geles están al 1.2% de agarosa; M: marcador de 1 kb.

Apéndice 2

Identificación y eliminación de micoplasma en diferentes líneas celulares.

Una vez que se diferenciaron las células HBG3, se comenzó a trabajar con las otras dos líneas de células embrionarias de ratón R1 transgénicas (ver Figura 5) y la línea de MB. Al iniciar con el cultivo de las células mESC Control, mESC GDNF, MB Control y MB GDNF inducibles, se detectó en ellas contaminación por micoplasma (Figura 25B), un conjunto de patógenos que generan consecuencias adversas variables, entre los que destacan: niveles anormales de síntesis de proteínas, RNA y DNA, cambios del metabolismo, aberraciones cromosómicas, muerte celular y activación de la respuesta inmune, entre otros (Drexler & Uphoff, 2002; Mühlradt et al., 1997). Debido al valor de las líneas celulares se optó por tratarlas para erradicar el micoplasma.

Dos semanas después del tratamiento con plasmocina a cada una de las líneas infectadas, las mESC Control, mESC GDNF y MB GDNF inducible fueron negativas para micoplasma, a diferencia de las MB Control, que presentaron contaminación débil (Figura 25B). A pesar de que no es tan sencillo que los micoplasmas generen resistencia hacia la plasmocina por su doble mecanismo de acción hacia traducción de proteínas y síntesis de DNA (Romorini et al., 2013), se descartó la línea celular contaminada y se descongeló un nuevo vial de MB control para darle tratamiento. Al término de éste, arrojó un resultado negativo (Figura 25C).

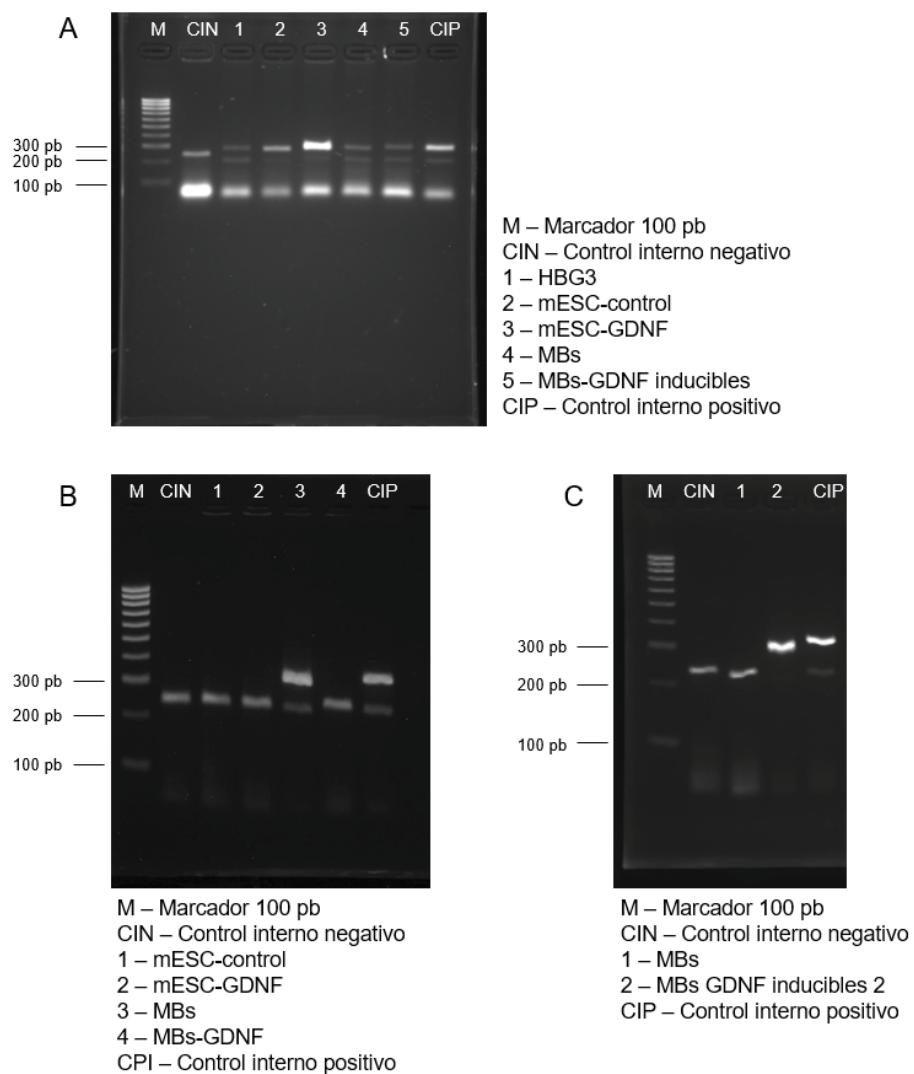


Figura 25. Identificación de micoplasma por PCR punto final en las mESC Control, mESC GDNF, MB Control y MB GDNF inducible. A) Electroforesis de la PCR punto final para identificar si las líneas celulares de mESC y MB están infectadas con micoplasma. Las HBG3, las mESC control y GDNF, además de los MBs, dieron positivas a la infección **B)** Resultados de la PCR para detectar micoplasma, después del tratamiento con plasmocina de las líneas de mESC y MB. Todas salieron negativas a excepción de los MBs. **C)** Resultado de la PCR para detectar micoplasma en un nuevo vial descongelado de MB control después del tratamiento y de un segundo vial de MB GDNF inducibles recién descongelados no tratados. Los MBs dieron negativo a micoplasma.

Referencias

- Airaksinen y Saarma (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*; 3, 383-394pp.
- Ang, S.-L., & Behringer, R. R. (2002). *3 - Anterior-Posterior Patterning of the Mouse Body Axis at Gastrulation* (J. Rossant & P. P. L. B. T.-M. D. Tam (Eds.); pp. 37–53). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012597951-1/50005-6>
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., & Jessell, T. M. (1999). Requirement for the Homeobox Gene Hb9 in the Consolidation of Motor Neuron Identity spinal MNs exhibit several levels of organization and function (Landmesser, 1978a, 1978b), and these have a molecular correlate in the selective patterns of expres. *Neuron*, 23, 659–674.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-badge, R. (2003). *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503.derm>
- Baloh, R. H., Tansey, G., Lampe, P. A., Fahrner, T. J., Enomoto, H., Simburger, K. S., Leitner, M. L., Araki, T., Johnson, E. M., Milbrandt, J., & Louis, S. (1998). *Artemin , a Novel Member of the GDNF Ligand Family , Supports Peripheral and Central Neurons and Signals through the GFR α 3 – RET Receptor Complex*. 21, 1291–1302.
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., & Beachy, P. A. (2002). Small molecule modulation of smoothed activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14071–14076. <https://doi.org/10.1073/pnas.182542899>
- Chen, X., Guo, Y., Jia, G., Liu, G., Zhao, H., & Huang, Z. (2018). Arginine promotes skeletal muscle fiber type transformation from fast-twitch to slow-twitch via Sirt1/AMPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.007>
- Cortés, D., Robledo-Arratia, Y., Hernández-Martínez, R., Escobedo-Ávila, I.,

- Bargas, J., & Velasco, I. (2016). Transgenic GDNF positively influences proliferation, differentiation, maturation and survival of motor neurons produced from mouse embryonic stem cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(SEP2016), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00217>
- Crossley, P. H., & Martin, G. R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, 121(2), 439–451.
- Cvetkovic, C., Rich, M. H., Raman, R., Kong, H., & Bashir, R. (2017). A 3D-printed platform for modular neuromuscular motor units. *Microsystems & Nanoengineering*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/micronano.2017.15>
- Dasen, J. S., Liu, J. P., & Jessell, T. M. (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of *Hox-c* activity. *Nature*, 425(6961), 926–933. <https://doi.org/10.1038/nature02051>
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2004). Protein family review The MAP2 / Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 6(1), 1–10. <http://genomebiology.com/2004/6/1/204>
- Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75–90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessel, T. M., & Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell*, 81(5), 747–756. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90536-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90536-7)
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M., & Briscoe, J. (1997). Pax6 Controls Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in Response to Graded Shh Signaling. *Cell*, 90(1), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80323-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80323-2)
- Ericson, Johan, Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, 87(4), 661–673. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81386-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81386-0)
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Frank, E., & Fischbach, G. D. (1979). *EARLY EVENTS IN NEUROMUSCULAR JUNCTION FORMATION IN VITRO Induction of Acetylcholine Receptor Clusters in the Postsynaptic Membrane and Morphology of Newly Formed Synapses*. 83(October).
- Furst, D. O., Osborn, M., & Weber, K. (1989). Myogenesis in the mouse embryo: Differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin

- in myofibril assembly. *Journal of Cell Biology*, 109(2), 517–527. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.517>
- Goolsby, J., Marty, M. C., Heletz, D., Chiappelli, J., Tashko, G., Yarnell, D., Fishman, P. S., Dhib-jalbut, S., Bever, C. T., Pessac, B., & Trisler, D. (2003). *Hematopoietic progenitors express neural genes*. 2–7.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., & Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5), 749–765. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00497-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00497-5)
- Gupta, S., Verfaillie, C., Chmielewski, D., Kren, S., Eidman, K., Connaire, J., Heremans, Y., Lund, T., Blackstad, M., Jiang, Y., Luttun, A., & Rosenberg, M. E. (2006). *Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells*. 612–624. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006030275>
- Heikinheimo, M., Lawshé, A., Shackelford, G. M., Wilson, D. B., & MacArthur, C. A. (1994). Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mechanisms of Development*, 48(2), 129–138. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0925-4773(94)90022-1)
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simpson, L. C., Moffet, B., Vandlen, R. A., Koliatsos, V. E., & Rosenthal, A. (1994). GDNF: A potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 266(5187), 1062–1064. <https://doi.org/10.1126/science.7973664>
- Hollyday, M., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1995). Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mechanisms of Development*, 52(1), 9–25. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(95\)00385-E](https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00385-E)
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., & Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41–49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
- Juuri, E., Saito, K., Ahtiainen, L., Seidel, K., Tummers, M., Hochedlinger, K., Klein, O. D., Thesleff, I., & Michon, F. (2012). Sox2+ Stem Cells Contribute to All Epithelial Lineages of the Tooth via Sfrp5+ Progenitors. *Developmental Cell*, 23(2), 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.05.012>
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., & Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development*, 125(13), 2521–2532.
- Kanning, K. C., Kaplan, A., & Henderson, C. E. (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), 409–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135722>
- Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Creedon, D. J.,

- Johnson Jr, E. M., & Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*, 384(6608), 467–470. <https://doi.org/10.1038/384467a0>
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(5), 389–398. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.389>
- Lengner, C. J., Camargo, F. D., Hochedlinger, K., Welstead, G. G., Zaidi, S., Gokhale, S., Scholer, H. R., Tomilin, A., & Jaenisch, R. (2007). Oct4 Expression Is Not Required for Mouse Somatic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*, 1(4), 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.07.020>
- Li, G., Shao, K., & Umeshappa, C. S. (2019). 3 - Recent progress in blood-brain barrier transportation research. In H. Gao & X. Gao (Eds.), *Brain Targeted Drug Delivery System* (pp. 33–51). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00003-2>
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. (1993). GDNF : A glial cell line-derived neurotrophic factor for mid. *Science*, 260(May), 1130–1132.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., & Aizawa, S. (1995). Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes and Development*, 9(21), 2646–2658. <https://doi.org/10.1101/gad.9.21.2646>
- McMahon, A. P., & Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62(6), 1073–1085. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90385-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90385-R)
- Menezes, J. R. L., & Luskin, M. B. (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *Journal of Neuroscience*, 14(9), 5399–5416. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05399.1994>
- Middleton, P., Jaramillo, F., & Schuetze, S. M. (1986). *Forskolin increases the rate of acetylcholine receptor desensitization at rat soleus endplates I-1*. 83(July), 4967–4971.
- Milbrandt, J., Sauvage, F. J. De, Fahrner, T. J., Baloh, R. H., Leitner, M. L., Tansey, G., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Kotzbauer, P. T., Simburger, K. S., Golden, J. P., Davies, J. A., Vejsada, R., Kato, A. C., Hynes, M., Sherman, D., Nishimura, M., Wang, L., Vandlen, R., ... Geneva, C.-. (1998). *Persephin , a Novel Neurotrophic Factor Related to GDNF and Neurturin*. 20, 245–253.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., & Yamanaka, S. (2003). *The Homeoprotein Nanog*

Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. 113, 631–642.

- Mühlradt, P. F., Kieß, M., Meyer, H., Süßmuth, R., & Jung, G. (1997). Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *Journal of Experimental Medicine*, 185(11), 1951–1958. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1951>
- Muhr, J., Graziano, E., Wilson, S., Jessell, T. M., & Edlund, T. (1999). Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in Gastrula stage chick embryos. *Neuron*, 23(4), 689–702. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)80028-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80028-3)
- Mulas, C., Kalkan, T., von Meyenn, F., Leitch, H. G., Nichols, J., & Smith, A. (2019). Correction: Defined conditions for propagation and manipulation of mouse embryonic stem cells (doi:10.1242/dev.173146). *Development (Cambridge)*, 146(7). <https://doi.org/10.1242/dev.178970>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-nebenius, D., Chambers, I., & Smith, A. (1998). *Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4.* 95, 379–391.
- Novitsch, B. G., Chen, A. I., & Jessell, T. M. (2001). Coordinate Regulation of Motor Neuron Subtype Identity and Pan-Neuronal Properties by the bHLH Repressor Olig2. *Neuron*, 31(5), 773–789. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00407-X)
- Onesto, M. M., Short, C. A., Rempel, S. K., Catlett, T. S., & Gomez, T. M. (2021). *Growth Factors as Axon Guidance Molecules: Lessons From in vitro Studies.* 15(May). <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.678454>
- Park, H. S., Liu, S., McDonald, J., Thakor, N., & Yang, I. H. (2013). Neuromuscular junction in a microfluidic device. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference, 2013*, 2833–2835. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6610130>
- Park, J. W., Vahidi, B., Taylor, A. M., Rhee, S. W., & Jeon, N. L. (2006). Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nature Protocols*, 1(4), 2128–2136. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.316>
- Purves Dale, Augustine George, Fitzpatrick David, Hall William, LaMantia Anthony-Samuel, Mooney Richard, Platt Michael, W. L. (Ed.). (2018). *Neuroscience* (6a ed.). Sinauer Associates.
- Que, J., Okubo, T., Goldenring, J. R., Nam, K. T., Kurotani, R., Morrissey, E. E., Taranova, O., Pevny, L. H., & Hogan, B. L. M. (2007). Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*, 134(13), 2521–2531. <https://doi.org/10.1242/dev.003855>

- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., & Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*, *81*(3), 445–455. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90397-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90397-6)
- Romorini, L., Riva, D. A., Blüguermann, C., Videla Richardson, G. A., Scassa, M. E., Sevlever, G. E., & Miriuka, S. G. (2013). Effect of Antibiotics against Mycoplasma sp. on Human Embryonic Stem Cells Undifferentiated Status, Pluripotency, Cell Viability and Growth. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070267>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, *4*(1–2), 7–25.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, *7*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., & Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, *358*(6388), 687–690. <https://doi.org/10.1038/358687a0>
- Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the stem cell potency: The various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00134>
- Sinha, S., & Chen, J. K. (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nature Chemical Biology*, *2*(1), 29–30. <https://doi.org/10.1038/nchembio753>
- Smith, J. L., & Schoenwolf, G. C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends in Neurosciences*, *20*(11), 510–517. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01121-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01121-1)
- Solter, D., & Knowles, B. B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(11), 5565–5569. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5565>
- Southam, K. A., King, A. E., Blizzard, C. A., McCormack, G. H., & Dickson, T. C. (2013). Microfluidic primary culture model of the lower motor neuron-neuromuscular junction circuit. *Journal of Neuroscience Methods*, *218*(2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.06.002>
- Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(OCT), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>

- Stoklund Dittlau, K., Krasnow, E. N., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Kerstens, A., Giacomazzi, G., Pavie, B., Rossaert, E., Beckers, J., Sampaolesi, M., Van Damme, P., & Van Den Bosch, L. (2021). Human motor units in microfluidic devices are impaired by FUS mutations and improved by HDAC6 inhibition. *Stem Cell Reports*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.029>
- Tremml, G., Singer, M., & Malavarca, R. (2008). Culture of mouse embryonic stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, SUPPL. 5, 1–19. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01c04s5>
- Uzel, S. G. M., Platt, R. J., Subramanian, V., Pearl, T. M., Rowlands, C. J., Chan, V., Boyer, L. A., So, P. T. C., & Kamm, R. D. (2016). *Microfluidic device for the formation of optically motor units*. August.
- Vorbrodt, A., Konwinski, M., Solter, D., & Koprowski, H. (1977). Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Developmental Biology*, 55(1), 117–134. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90324-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90324-4)
- Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L. R., Martinez, S., & Martin, G. R. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development*, 124(15), 2923–2934.
- Wichterle, Hynek, Liebaram, I., Porter, J. y Jessel, T. (2002). Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into motor neurons. *Cell*, 110, 385–397.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., & Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200), 684–687. <https://doi.org/10.1038/336684a0>
- Wu, C. Y., Whye, D., Glazewski, L., Choe, L., Kerr, D., Lee, K. H., Mason, R. W., & Wang, W. (2011). Proteomic assessment of a cell model of spinal muscular atrophy. *BMC Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-25>
- YAFFE, D., & SAXEL, O. R. A. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725–727. <https://doi.org/10.1038/270725a0>
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00847-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00847-x)
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., & Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194), 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature06968>
- Yu, L. M. Y., Leipzig, N. D., & Shoichet, M. S. (2008). Promoting neuron adhesion and growth. *Materials Today*, 11(5), 36–43. <https://doi.org/10.1016/S1369->

7021(08)70088-9

- Zahavi, E. E., Ionescu, A., Gluska, S., Gradus, T., Ben-Yaakov, K., & Perlson, E. (2015). A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. *Journal of Cell Science*, *128*(6), 1241–1252. <https://doi.org/10.1242/jcs.167544>
- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., & Ma, L. (2012). Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules*, *17*(6), 6196–6236. <https://doi.org/10.3390/molecules17066196>
- Zhuang, S., Zhang, Q., Zhuang, T., Evans, S. M., Liang, X., & Sun, Y. (2013). Expression of Isl1 during mouse development. *Gene Expression Patterns*, *13*(8), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2013.07.001>