



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ESTUDIO A LARGO PLAZO DE LA DIFERENCIACIÓN  
DOPAMINÉRGICA IN VIVO DE CÉLULAS TRONCALES  
PLURIPOTENTES DERIVADAS DE UN PACIENTE CON  
TRIPLICACIÓN DE ALFA-SINUCLEÍNA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

Giselle Alexa Delgado González

**TUTORA PRINCIPAL:**

Dra. Magdalena Guerra Crespo

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

Dra. María Rosa Ávila Costa

Dr. José Luis Ordoñez Librado

M. en C. Enrique Montiel Flores

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echegaray

Cd. Mx.

3 de octubre de 2023





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Agradecimientos académicos

Este proyecto se llevó a cabo bajo la tutoría de la Dra. Magdalena Guerra Crespo en el laboratorio de Medicina Regenerativa del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Para realización de este trabajo se contó con el donativo de DGAPA-PAPIIT IN211419, IN219623, CONACyT A1-S-10064 y con la beca CONACyT No.30884.

Agradezco a la Bióloga experimental Marcela Palomero Rivero del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM por todo el apoyo técnico durante el trabajo de laboratorio, así como por sus recomendaciones, comentarios y sugerencias académicas.

Al Dr. Omar Collazo Navarrete y a la Dra. Gilda Guerrero Flores del Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos por sus consejos e insumos brindados.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia y el Dr. Abraham Rosas Arellano de la Unidad de Microscopía del IFC de la UNAM por sus enseñanzas y apoyo en la obtención de imágenes de microscopía confocal.

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

Al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada en el Instituto Nacional de Biotecnología, por su asesoría en el procesamiento de imágenes y fundamentos básicos de microscopía confocal.

A la Dra. Birgitt Schüle de la Universidad de Stanford por su colaboración académica en el proyecto, las líneas celulares donadas e insumos brindados.

A la Dra. Magdalena Guerra Crespo, gracias por confiar en mí y aceptarme como su alumna, por su enorme paciencia y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto y por las enseñanzas y retroalimentación brindadas.

A los Doctores María Rosa Ávila Costa, José Luis Ordoñez Librado, Alicia Elizabeth Hernández Echegaray y al M. en C. Enrique Montiel Flores, por la revisión a mi tesis.

## Agradecimientos personales

*A mi madre por esforzarse día a día para que no me falte nada*

*A mi mamá Gusinita por su cuidado, apoyo y compañía incondicional*

*A mi abuelo por estar siempre presente y apoyarme cuando lo necesitaba*

*A mi tía por inspirarme a ser valiente y luchar por mis sueños*

*A Carlos por siempre confiar en que podía lograrlo y apoyarme desde principio a fin sin soltarme la mano*

*A la Doctora Magdalena por su paciencia y comprensión en los momentos más difíciles, muchas gracias por siempre incentivarme a concluir este proyecto*

*A mis compañeros de laboratorio Daniel, Rodrigo, Veronica, Andrea, Francisco por transmitirme sus conocimientos y aconsejarme durante toda mi estadía en el laboratorio*

*A mis amigas de la Licenciatura Ana Cristina, Ana Lilia y Aimeé por hacer más amenos los semestres, siempre hicimos el mejor equipo chicas*

*A las ratas de la cepa Wistar con las cuales trabajé en este proyecto, gracias por ayudarnos a entender un poco más de la enfermedad de Parkinson*

*A mi familia sin los cuales no hubiera podido lograrlo*

## Contenido

<b>ABREVIATURAS</b>	6
<b>RESUMEN</b>	8
<b>CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO</b>	9
<b>1.1 Introducción</b>	9
1.1.1 La enfermedad de Parkinson. ....	9
1.1.2 Epidemiología .....	9
1.1.3 Síntomas .....	9
1.1.4 Fisiopatología .....	10
1.1.5 La alfa-sinucleína.....	11
1.1.6 Fisiopatología de la alfa-sinucleína .....	12
1.1.7 Modelos de la enfermedad de Parkinson .....	16
1.1.8 Tratamientos para la enfermedad de Parkinson.....	17
1.1.9 Las células troncales .....	17
1.1.10 Células troncales pluripotentes .....	18
1.1.11 Células troncales embrionarias .....	18
1.1.12 Células troncales pluripotentes inducidas .....	19
1.1.13 Diferenciación dopaminérgica de las CTP <i>in vitro</i> .....	19
<b>1.2 Antecedentes</b>	20
1.2.1 Las células troncales pluripotentes en la EP .....	21
1.2.2 La SNpc como sitio de trasplante celular para recuperar el circuito nigro-striatal afectado en la enfermedad de Parkinson.....	23
1.2.3 Células trocales pluripotentes inducidas humanas con triplicación del gen <i>SNCA</i> como modelo de la enfermedad de Parkinson .....	24
1.2.4 CTPIh y su estudio en el laboratorio a través de trasplantes en la SNpc.....	26
<b>1.3 Justificación</b>	29
<b>1.4 Pregunta de Investigación</b>	30
<b>1.5 Hipótesis</b>	30
<b>1.6 Objetivo general</b>	30
<b>1.7 Objetivos particulares</b>	30
<b>CAPÍTULO 2: ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	31
2.1 Estrategia experimental .....	311
2.2 Cultivo de células troncales pluripotentes inducidas humanas.....	31
2.3 Animales.....	32

2.4 Grupos de estudio.....	32
2.5 Lesión del sistema nigro-estriatal con 6-hidroxidopamina .....	33
2.6 Prueba de giro inducida con anfetamina .....	33
2.7 Trasplante celular .....	34
2.8 Inmunosupresión .....	34
2.9 Obtención del tejido cerebral .....	34
2.10 Inmunofluorescencia.....	34
2.11 Microscopía .....	37
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b>	<b>38</b>
3.1 Las células troncales pluripotentes inducidas humanas trasplantadas en etapa de placa de piso son capaces de sobrevivir en la Sustancia Nigra pars compacta a 2 meses postrasplante.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.2 Las células troncales pluripotentes inducidas humanas trasplantadas en etapa de placa de piso expresan un fenotipo neuronal inmaduro en la SNpc a 2 meses postrasplante.....	40
3.3 Las células trasplantadas en etapa de placa de piso expresan TH en la SNpc a 2 meses postrasplante.....	43
3.4 La línea celular CTRL y 3X SNCA trasplantadas en etapa de placa de piso expresan alfa-sinucleína en la SNpc a 2 meses postrasplante .....	45
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSION</b> .....	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 5:</b>	
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>54</b>

## ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
a-sin	alfa-sinucleína
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CL	Cuerpos de Lewy
CT	Célula Troncal
CTE	Células troncales embrionarias
CTEh	Células troncales embrionarias humanas
CTP	Células troncales pluripotentes
CTPih	Células troncales pluripotentes inducidas humanas
CTPir	Células troncales inducidas de ratón
CTRL	Control
DA	Dopamina
DAérgico	Dopaminérgico/a(s)
DAm	Dopaminérgico/a(s) mesencefálicas
DAT	Transportador de dopamina
DCX	Doblecortina
dpt	Días postrasplante
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
FGF8	Factor de crecimiento fibroblástico 8
FT	Factor de transcripción

hfVM	Tejido mesencefálico ventral fetal humano
MCI	Masa celular interna
mpt	Meses postrasplante
NAC	Componente no amiloide
PP	Placa de Piso
SN	Sustancia Nigra
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SNC	Sistema Nervioso Central
SNCA	Gen <i>SNCA</i>
3X <i>SNCA</i>	Línea celular proveniente de un familiar en primer grado que no cursa con EP
KO <i>SNCA</i>	Línea isogénica <i>knockout</i> de la 3X <i>SNCA</i>
TGF- $\beta$ 3	Factor de crecimiento transformante beta 3
TH	Tirosina Hidroxilasa
Vmat2	Transportador vesicular 2 de monoaminas



## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la neurodegeneración inicialmente específica de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia nigra pars compacta (SNpc), que proyectan sus axones al núcleo estriado. La falta de dopamina en el núcleo estriado genera los síntomas motores característicos de la enfermedad. La etiopatogenia de la EP está fuertemente relacionada con la expresión de la proteína alfa-sinucleína (a-sin). Por una parte, mutaciones como la triplicación del gen *SNCA* (3X *SNCA*) dan origen al desarrollo de formas familiares de la EP, además, la a-sin es el componente principal de los cuerpos de Lewy, agregados que se encuentran mayormente en el mesencéfalo, y que son el sello histopatológico de la EP. Sin embargo, es muy poco conocido el papel fisiológico de la a-sin en el desarrollo del linaje dopaminérgico mesencefálico (DAm), así como el efecto de su sobreexpresión desde etapas tempranas de diferenciación. En este sentido, las células troncales pluripotentes inducidas humanas (CTPih) provenientes de pacientes afectados con EP familiar, sirven como un modelo de la EP que permite estudiar las bases de la neurodegeneración causada por la proteína a-sin en el fenotipo DAm. Nuestro grupo ha estudiado el desarrollo de dicho fenotipo en la SNpc, utilizando células troncales embrionarias de ratón y humanas (CTEh) trasplantadas en la etapa de cuerpo embriode (CE), es decir, cuando aún no están neuralizadas. Se determinó que la SNpc es un nicho permisivo para la generación de células tirosina hidroxilasa positivas (TH<sup>+</sup>), la enzima limitante en la síntesis de dopamina. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar cualitativamente, el desarrollo del linaje DAm en la SNpc, de CTPih trasplantadas en la etapa de placa de piso (PP), una etapa de diferenciación DA muy temprana. Así mismo, determinar si la sobreexpresión de a-sin tiene algún efecto en la sobrevivencia y el desarrollo del fenotipo TH<sup>+</sup> *in vivo*. Para ello, empleamos una línea de CTPih proveniente de un paciente con 3X *SNCA*, una línea control (CTRL) proveniente de un familiar en primer grado que no cursa con EP y una línea isogénica *knockout* de la 3X *SNCA* (KO *SNCA*). Las tres líneas celulares fueron trasplantadas en la SNpc de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y animales control sin lesión (inyectados con solución salina). Los resultados obtenidos muestran que las tres líneas celulares sobreviven a 2 meses postrasplante, además de que exhiben un fenotipo neuronal inmaduro (doblecortina<sup>+</sup>/β-III tubulina<sup>+</sup>). Interesantemente, se observaron aparentemente mayor número de células TH<sup>+</sup> en la línea CTRL, que en la de 3X *SNCA*, y en la línea KO *SNCA*. Dichos hallazgos indican que la SNpc es un nicho permisivo para la sobrevivencia y diferenciación celular de CTPih trasplantadas en la etapa de PP y sugieren que la a-sin en este periodo, afecta la adquisición del fenotipo TH<sup>+</sup> *in vivo*. Por otra parte, la expresión de a-sin se observa en mayor proporción en la línea 3X *SNCA* en relación al CTRL, y como se esperaba, prácticamente sin expresión en la KO *SNCA*.

## **CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Introducción**

#### **1.1.1 La enfermedad de Parkinson.**

El padecimiento fue descrito por primera vez en 1817 por James Parkinson en “Un ensayo sobre la parálisis temblorosa” (Parkinson, 1817 y 2002). Posteriormente, Jean-Martin Charcot en 1877 nombró propiamente a este padecimiento como Enfermedad de Parkinson (EP) y señaló la bradicinesia como uno de los principales síntomas asociados (Charcot, 1877; Goetz, 2011). Cien años más tarde, Trétiakoff identificó la pérdida de células de la sustancia nigra (SN) como un factor determinante en el desarrollo de dicha enfermedad (Trétiakoff, 1921; Goetz, 2011).

#### **1.1.2 Epidemiología**

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y el trastorno del movimiento neurodegenerativo más frecuente. Tiene una prevalencia mundial de 35 casos por cada 100 000 habitantes, con un aumento en la incidencia de 5 a 10 veces a partir de los 60 a 90 años de vida (Simon et al., 2020). En México, no se cuenta con estudios multicéntricos de la prevalencia de la EP, sin embargo, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Ciudad de México con la finalidad de dar una aproximación de la situación de esta enfermedad realizó un estudio analítico de 402 casos evaluados, de los cuales 212 pacientes presentaron EP a la edad media de 63 años (Rodríguez et al., 2011). Por su parte, un estudio realizado en el 2022 encontró una prevalencia de la EP del 2.3% (Llibre-Guerra et al., 2022).

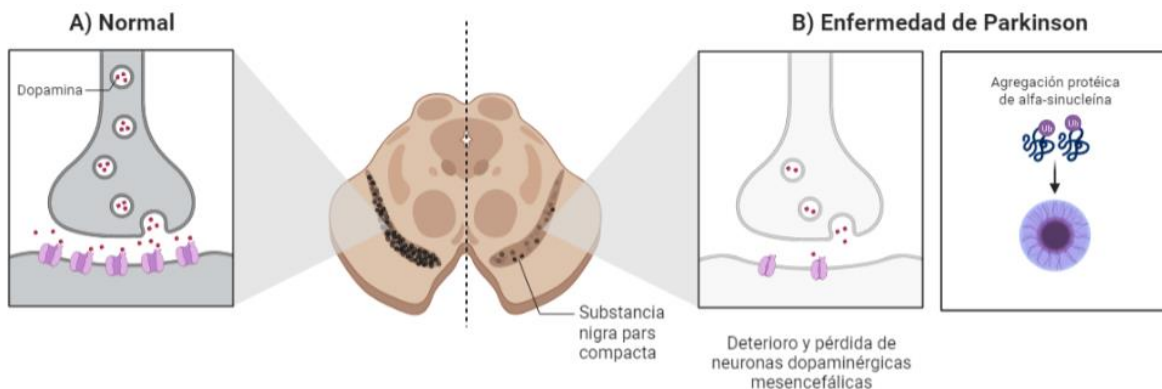
#### **1.1.3 Síntomas**

La EP es un trastorno neurológico progresivo caracterizado por una sintomatología tanto motora como no motora. Los principales síntomas motores pueden agruparse bajo el acrónimo TRAI: Temblor en estado de reposo, rigidez, aquinesia (o bradicinesia) e inestabilidad postural (Jankovic, 2008). Además, los pacientes con

EP presentan síntomas no motores como anomalías cognitivas, trastornos del sueño, trastornos del estado de ánimo, dolor y trastornos sensoriales (Sung & Nicholas, 2013).

### 1.1.4 Fisiopatología

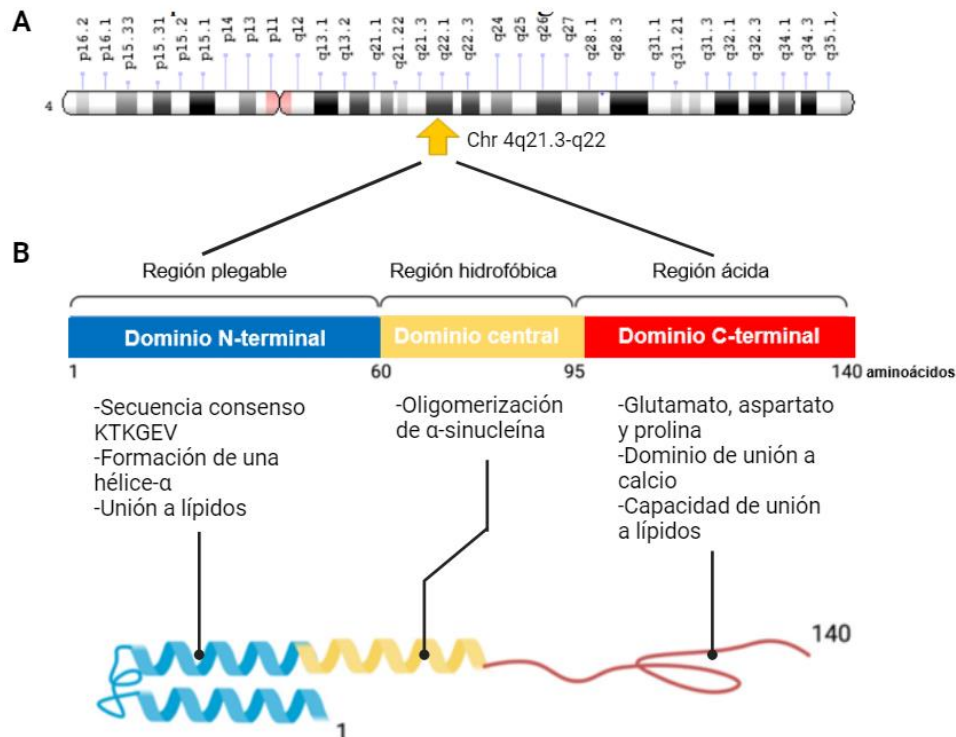
Patológicamente, la EP se define como la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) mesencefálicas (DAm) de la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc) ubicada en el cerebro medio y la acumulación generalizada de la proteína intracelular  $\alpha$ -sin (Figura 1). En el estadio temprano de la EP, Al inicio de los síntomas, la DA putamenal se agota en aproximadamente 80% y se pierde aproximadamente 60% de las neuronas dopaminérgicas de SNpc, la pérdida de las neuronas DA se da específicamente en la SN ventrolateral, sin embargo, conforme va progresando la enfermedad, ocurre pérdida completa de las neuronas DA que proyectan al núcleo estriado, particularmente al putamen y al caudado, lo que conduce al deterioro de la vía nigroestriatal involucrada en regular el movimiento motor (Dauer y Przedborski, 2003; Poewe et al., 2017; Simon et al., 2020).



**Figura 1. Neuropatología en la Enfermedad de Parkinson.** Esquema donde se muestra un corte de mesencéfalo de humano, se observa la pigmentación característica de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y la presencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (DAm) (A). En contraste, en la EP se observa despigmentación y pérdida de las neuronas DAm en la SNpc del cerebro medio (B), así como la agregación intracelular de la proteína alfa-sinucleína ( $\alpha$ -sin) (imagen creada en Biorender.com).

### 1.1.5 La alfa-sinucleína

La alfa-sinucleína ( $\alpha$ -sin) es una proteína citoplasmática que se encuentra expresada predominantemente en el cerebro, en estructuras como la SNpc, amígdala, neocorteza, hipocampo, bulbo olfatorio, núcleo estriado, tálamo y cerebelo (Taguchi et al., 2016; Yang et al., 1999). Se expresa también en otros tejidos y órganos, tales como sangre, médula ósea, riñón, páncreas, músculo esquelético, pulmones, corazón y placenta. Sus principales roles incluyen la regulación de la fusión de vesículas presinápticas con la membrana celular, la interacción con proteínas sinápticas asociadas a la exocitosis vesicular, la estabilización de complejos de la cadena transportadora de electrones y el aumento de la velocidad de formación de microtúbulos. Sin embargo, su función fisiológica en los diferentes compartimentos celulares en los que se localiza, sólo se comprende parcialmente (Bernal-Conde et al., 2020; Lashuel et al., 2013). Estructuralmente, tiene un peso molecular de 14.5 kDA y está conformada por 140 aminoácidos (Lee y Gilbert, 2016; Manzanza et al., 2021). Es codificada por el gen *SNCA*, ubicado en la posición 21 del brazo largo del cromosoma 4 (Chr 4q21.3-q22) (Figura 2A) y consta de tres dominios. El dominio N-terminal está compuesto de cuatro repeticiones que contienen una secuencia consenso KTKEGV, una región predispuesta a plegarse en hélices alfa y que se ha planteado está vinculada con la capacidad de unión a lípidos (Wales et al., 2013). El dominio central llamado componente no amiloidogénico (“NAC”), de las siglas en inglés “non-amyloid component”, tiene la característica de ser hidrófobo y amiloidogénico (Bendor et al., 2013; Manzanza et al., 2021). Diversos estudios han concluido que este dominio está asociado con la agregación de  $\alpha$ -sin y se ha vinculado con el desarrollo de sinucleinopatías cuando existen mutaciones puntuales en dicha región (Polymeropoulos et al., 1997; Proukakis et al., 2013). Finalmente, el dominio C-terminal proporciona flexibilidad al polipéptido, además de ser una región ácida y desestructurada (Figura 2B) (Manzanza et al., 2021).



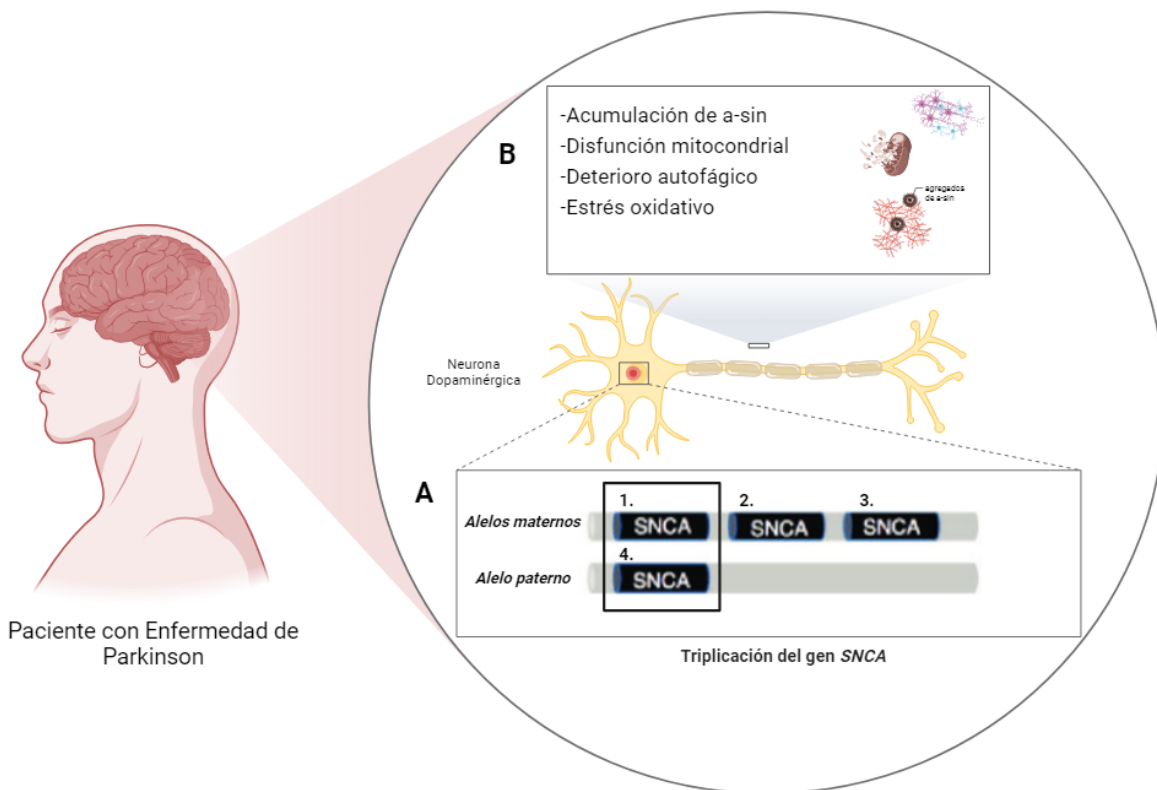
**Figura 2. Estructura de la proteína alfa-sinucleína.** (A) Ubicación del gen *SNCA* en el cromosoma 4 posición 22.1 del brazo largo. (B) Representación esquemática de la estructura de la alfa-sinucleína (a-sin). Está compuesta por 140 aminoácidos que se organizan en tres dominios característicos. El dominio N-terminal anfipático (en tono azul), contiene cuatro regiones de 11 repeticiones imperfectas con la secuencia consenso KTKGEV, lo que facilita la configuración de una hélice- $\alpha$  y le posibilita la unión a lípidos. El dominio central (en color amarillo) es conocido como el componente no amiloide (NAC), y es el que permite la oligomerización de a-sin debido a su composición hidrofóbica. El dominio C-terminal (en tono rojo), contiene residuos ácidos (glutamato y aspartato) y prolina, este forma un dominio de unión a calcio, que incrementa su capacidad de unión a lípidos (imagen creada en Biorender.com).

### 1.1.6 Fisiopatología de la alfa-sinucleína

Los efectos patológicos de la acumulación anormal de a-sin citoplasmática y sus variantes anómalas en las neuronas y la glía, están vinculados a procesos neurodegenerativos conocidos como sinucleopatías (Galvin et al., 2001; Martí et al., 2003). Estas incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica, siendo la EP la sinucleinopatía más prevalente (Langston et al., 2015; Sekigawa et al., 2015; Peelaerts y Baekelandt, 2016). En las últimas décadas, se han relacionado dos hallazgos principales en el desarrollo de

la EP con la proteína a-sin: Se determinó que mutaciones puntuales del gen *SNCA* dan origen al desarrollo de formas familiares de la EP (Polymeropoulos et al., 1997), la proteína a-sin es un componente principal de los cuerpos de Lewy (CL), los cuáles son el sello histopatológico del cerebro con EP (Spillantini et al., 1997). Debido a esto, a la EP se le define como una alfa-sinucleopatía con CL depositados en el mesencéfalo. Los CL son inclusiones intracitoplasmáticas que constan de más de 70 proteínas y están compuestos mayormente de agregados fibrilares de a-sin (Bernal-Conde et al., 2020; Cacabelos, 2017). La agregación de los CL ocurre inicialmente en el citoplasma de las neuronas monoaminérgicas (entre ellas las DA) del tronco encefálico y en neuronas DA del sistema olfatorio; conforme progresa la EP; también se pueden encontrar en ciertas regiones cerebrales límbicas y neocorticales (Poewe et al., 2017).

En años recientes, se ha identificado una relación entre la duplicación y/o triplicación del gen *SNCA* y el desarrollo de una forma familiar de la EP, lo que indica que los niveles aumentados de a-sin normal son suficientes para causar la enfermedad. El análisis neuropatológico de pacientes de algunas familias ha revelado que las mutaciones del gen *SNCA* se heredan de manera autosómica dominante y que comparten un cuadro neuropatológico similar a la forma idiopática como la inclusión de CL en diferentes áreas del SNC (Figura 3A) (Lee y Gilbert, 2016). La acumulación de a-sin, la disfunción mitocondrial, el deterioro autofágico y el estrés oxidativo y del retículo endoplásmico son hallazgos comunes en la cascada patógena de la EP (Figura 3B) (Cacabelos, 2017).



**Figura 3. Fisiopatología de la alfa-sinucleína.** (A) Representación de los 4 alelos resultantes de la triplicación del gen *SNCA*. Esquema de los 4 alelos del gen *SNCA* (1-4), en el alelo de origen materno, se produjo una triplicación mediante dos duplicaciones no simultáneas de dicho gen, el recuadro con borde negro exhibe la dosis genética estándar. (B) Alteraciones a nivel fisiológico causadas por la triplicación del gen *SNCA*. (Imagen creada en Biorender.com).

Actualmente, el origen y el desarrollo prodromal de la patología se desconocen, sin embargo, la hipótesis de Braak sugiere que el daño se va propagando gradualmente en el cerebro, dado que se observa a la  $\alpha$ -sin depositada en los cuerpos de Lewy en diferentes estructuras conforme avanza el tiempo de la enfermedad (Braak et al., 2003). En la primera etapa, los cuerpos de inclusión relacionados con la EP aparecen únicamente en las neuronas de proyección fusiformes del núcleo motor IX/X dorsal y, en algunos casos, en las células de proyección de la zona reticular intermedia. Por lo tanto, la patología se limita a una pequeña franja de materia gris que se extiende desde el ala cinerea por debajo del revestimiento endimario del cuarto ventrículo hasta la superficie ventrolateral de la parte inferior del tronco encefálico, entre el surco dorsolateral y el límite superior de la oliva (Estadio 1). En

el Estadio 2, se observa una afectación más acentuada tanto del núcleo motor dorsal IX/X como de la zona reticular intermedia. Una característica clave es la primera aparición de CL en las neuronas de proyección cargadas de lipofuscina (lipopigmento relacionado a la peroxidación lipídica y que indica daño celular severo), de los núcleos del rafe caudal (nucleus raphes magnus, obscurus, pallidus) y la formación reticular. Por otra parte, el Estadio 3, se caracteriza por la afectación de un subconjunto de melanoneuronas en la SN y la afectación de neuronas de proyección cargadas de lipofuscina en el núcleo magnocelular del cerebro anterior basal. Notablemente, no hay indicación de despigmentación macroscópicamente detectable de la SN y el daño allí inicialmente está restringido a neuronas de proyección melanizadas de los subnúcleos posterolateral y posteromedial. Más adelante, en el estadio 4, se observa una marcada devastación de las melanoneuronas en los subnúcleos vulnerables de la SN. La comparación con la condición control revela una pérdida significativa de neuronas, especialmente en las regiones posteriores de la *pars compacta*. En algunos casos, la despigmentación local es lo suficientemente pronunciada como para ser reconocida macroscópicamente. El grado de daño observado en las estructuras subcorticales y mesocorticales mencionadas anteriormente aumenta aún más, las estructuras vulnerables de la SN se encuentran casi desprovistas de neuronas cargadas de melanina y, en consecuencia, presentan una palidez evidente en la inspección macroscópica. Posteriormente, en el Estadio 5, se observa el progreso de la lesión en la corteza, iniciando en la mesocorteza temporal anteromedial. Finalmente, durante el Estadio 6, la progresión patológica sigue su curso en la neocorteza, la cual se ve comprometida, comenzando por las áreas de asociación sensorial de alto nivel y las regiones prefrontales; mientras que las áreas premotoras/asociativas de primer orden y los campos motores/sensoriales primarios siguen un patrón similar (Braak et al., 2003).

De manera que, la relevancia del estudio de a-sin para comprender el origen de la EP ha impulsado el desarrollo de numerosos modelos animales basados en la inactivación o eliminación del gen *SNCA* endógeno o la sobreexpresión de la



proteína  $\alpha$ -sin, a través de un enfoque transgénico con varios promotores o por vectores virales, entre otros (Chesselet, 2008).

### **1.1.7 Modelos de la enfermedad de Parkinson**

Con la finalidad de estudiar los mecanismos citopatológicos, moleculares, fisiológicos y genéticos, así como para aplicar estrategias terapéuticas en la EP, se han desarrollado, durante las últimas décadas, diversos modelos *in vivo* e *in vitro*. Los modelos animales de EP, por lo general, se pueden dividir en aquellos que usan neurotoxinas ambientales o sintéticas y aquellos que usan la expresión *in vivo* de mutaciones de ciertos genes (Blesa et al., 2012). Así mismo, la creación de modelos genéticos ha permitido el estudio de las principales vías moleculares y bioquímicas involucradas en la patogénesis y la etiología genética de la EP, así como la identificación de factores clave en términos de diagnóstico, diseño de medicamentos y/o terapia. Actualmente los principales genes asociados con el origen de la EP son *SNCA*, *Parkina*, *LRKK2*, *PINK1* y *DJ-1* (Blesa et al., 2012; Saiki et al., 2012; Hisahara and Shimohama, 2011).

Por su parte, los modelos basados en el uso de neurotoxinas permiten producir estrés oxidativo y causar la muerte celular en poblaciones de neuronas DA de la vía nigroestriatal, como ocurre en la EP (Blesa et al., 2012). Uno de estos modelos se basa en la administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina análoga de la dopamina que se utiliza para generar hemiparkinsonismo. Dado que la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, su administración requiere de una inyección intracerebral directa (sitio blanco) mediante cirugía estereotáxica (SNpc y estriado o has medial del cerebro anterior) (Perese et al., 1989; Przedbroski et al., 1995). A las 24 h post-inyección, las neuronas DA comienzan a degenerarse de manera permanente y la dopamina estriatal disminuye por completo de 2 a 3 días después. Además, la administración sistemática de agonistas dopaminérgicos como la apomorfina, un agonista del receptor de dopamina, o la anfetamina, un agente liberador de dopamina (Hisahara and Shimohama, 2011) lo que permite observar un comportamiento motor asimétrico (giro inducido, rotación). Lo efectos de la lesión dependen de la dosis inyectada de la neurotoxina, el sitio de inyección y la

sensibilidad de la especie animal con la cual se trabaja (Betarbet et al., 2002; Faull & Laverty, 1969). No obstante, en general, una de las grandes ventajas de este modelo es el comportamiento motor cuantificable que permite el cribado farmacológico y la prueba de terapias de reemplazo celular (Deumens et al., 2002; Hisahara and Shimohama, 2011).

### **1.1.8 Tratamientos para la enfermedad de Parkinson**

Actualmente existen varios tratamientos para la EP, entre los que destacan la estimulación cerebral profunda mediante neurocirugía estereotáxica funcional, aplicable en sólo muy pocos casos, y la terapia de apoyo como fisioterapia y farmacoterapia. Por otro lado, las opciones terapéuticas actualmente disponibles no pueden detener ni revertir el proceso neurodegenerativo de la EP o incluso prevenir su manifestación, siendo posible sólo controlar los síntomas mediante varios fármacos disponibles (Oertel and Schulz, 2016; Singh et al., 2007). Estos tienen como objetivo principal aumentar los niveles de DA en el cerebro. El fármaco más empleado para reducir la sintomatología de la EP es la levodopa (L-DOPA), un precursor de la dopamina enfocado en reestablecer los niveles de DA en los ganglios basales (Boronat-García et al., 2016). Sin embargo, el tratamiento a largo plazo con L-DOPA se asocia con numerosos efectos motores adversos como acinesia, discinesia, desgaste y falta de dosis que limitan su uso (Singh et al., 2007). Debido a lo anterior, se ha expuesto la necesidad de encontrar un tratamiento que disminuya los síntomas motores a largo plazo sin la aparición de los efectos secundarios. En la búsqueda de nuevos abordajes experimentales, durante al menos 3 décadas se ha incursionado en la terapia experimental con células troncales como una alternativa para poner solución a dicho problema (Barker et al., 2015).

### **1.1.9 Las células troncales**

Las células troncales son aquellas que tienen el potencial de autorrenovarse y generar células diferenciadas, además de exhibir una amplia capacidad de llevar a

cabo divisiones celulares asimétricas, existir en una forma mitóticamente inactiva y regenerar clonalmente todos los diferentes tipos de células que constituyen a los tejidos (Morrison et al., 1997, 2010). Son clasificadas dependiendo de su potencial de diferenciación como totipotentes (capaces de formar el embrión y trofoblasto de la placenta, así como derivar las tres capas germinales embrionarias, mesodermo, endodermo y ectodermo); pluripotentes (que pueden dar origen a las 3 capas germinales y a todas las células presentes en un organismo), multipotentes (las cuales se diferencian en cualquier célula de un linaje específico a partir de una sola capa germinal) y unipotentes (sólo pueden dar origen a un tipo celular) (Keller, 2005; Alison et al., 2002).

#### **1.1.10 Células troncales pluripotentes**

Debido a su capacidad de autorrenovación, conservación de su potencial al replicarse y generación de todas las células presentes en un organismo, actualmente las células troncales pluripotentes (CTP) tienen un papel fundamental en la medicina regenerativa, ya que se utilizan como modelos celulares para comprender los mecanismos de diferentes patologías, detección de fármacos eficaces y el desarrollo de alternativas terapéuticas (Takahashi et al., 2007; Wu and Izpisua Belmonte, 2016). Las CTP se clasifican en células troncales embrionarias (CTE) y células troncales pluripotentes inducidas (CTPi) (Chin et al., 2009).

#### **1.1.11 Células troncales embrionarias**

Las CTE se derivan de la masa celular interna (MCI) del blastocisto durante la etapa embrionaria de gastrulación. Entre sus características principales destacan su capacidad para autorrenovarse y derivar múltiples linajes celulares especializados, así como mantenerse y expandirse como poblaciones de células indiferenciadas durante periodos prolongados de tiempo *in vivo* y de manera indefinida *in vitro* (Hipp and Atala, 2008; Keller, 2005; Sylvester and Longaker, 2004). Las CTE fueron aisladas por primera vez de la MCI de un embrión de ratón (CTEr) en 1981, y en 1988 se generaron las CTE humanas (CTEh) (Martin, 1981). Debido a sus

características únicas, tienen una gran importancia para la biología y medicina regenerativa, sin embargo, su aplicación clínica es limitada debido a la controversia ética en torno a su obtención (Hipp and Atala, 2008; Landry and Zucker, 2004).

#### **1.1.12 Células troncales pluripotentes inducidas**

La reprogramación exitosa de células somáticas diferenciadas en un estado pluripotente mediante la inducción de la coexpresión de cuatro factores de transcripción característicos de un fenotipo pluripotente (Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc) permitió la creación de las CTPi. Primeramente, a partir de fibroblastos se generaron CTPi de ratón (CTPir) en el año 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006) y el siguiente año, se generaron las CTPi humanas (CTPih) (Takahashi et al., 2007).

#### **1.1.13 Diferenciación dopaminérgica de las CTP *in vitro***

El avance en la caracterización de las cascadas de señalización celular y molecular implicadas en la diferenciación de las neuronas DAm *in vivo*, ha permitido el desarrollo de diversos protocolos de cultivo celular que simulan dichas condiciones *in vitro* con el objetivo de llevar a cabo una diferenciación DA guiada. Este modelado de la enfermedad permite tanto el estudio del efecto de los fármacos, así como su potencial empleo en terapias de reemplazo celular a través de trasplantes (Arenas et al., 2015). Las CTP humanas, ya sea las CTEh o las CTPih, son una opción viable para su uso en protocolos de diferenciación DA debido a que ofrecen una fuente celular renovable y escalable a partir de la cual se pueden obtener un importante número de células DA con características similares que permiten estudios con gran reproducibilidad (Parmar et al., 2020). En los primeros estudios, la diferenciación DA a partir de CTP se basó en el uso de células estromales o astrocitos alimentadores como inductores de la diferenciación, y en la agregación de cuerpos embrioides (CE) (Roy et al., 2006; Swistowski et al., 2009; Vazin et al., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos a través de estos protocolos frecuentemente mostraron una variabilidad considerable en la pureza y el número de las neuronas DAs generadas (Arenas et al., 2015; Oh, 2019; Parmar et al., 2020).

El estudio y recapitulación de las vías de señalización relacionadas con la diferenciación neuronal durante la etapa del desarrollo embrionario permitió generar protocolos más eficientes. En 2009, se desarrolló el método de “inhibición dual de la vía SMAD” (principal vía de señalización de ligandos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Ross and Hill, 2008), el cual, mediante el uso de moléculas inhibitoras de la señalización de BMP, nodal, activina y el TGF- $\beta$ , permitió diferenciar a las CTP humanas en células neurales sin la influencia de factores indefinidos, así como aumentar la eficiencia y heterogeneidad del cultivo (Arenas et al., 2015; Chambers et al., 2009). Posteriormente, se implementó la administración de sonic hedgehog (SHH, ligando implicado en la organización del cerebro medio durante la etapa de organogénesis), en conjunto con la inhibición dual de la vía SMAD durante la inducción neural de CTEh para obtener como resultado la derivación eficiente de células de la placa de piso (PP) (Fasano et al., 2010; Oh, 2019), que dan origen a las células DA. La especificación correcta mesencefálica se logró con la adición del inhibidor de la glucógeno sintetasa quinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), que activa la vía de WNT (wingless) que es esencial en el desarrollo de las neuronas DAm (Arenas et al., 2015; Chung et al., 2009). Este protocolo fue desarrollado por el grupo de Studer y colaboradores, quienes obtuvieron cultivos celulares con una clara expresión de marcadores dopaminérgicos como FoxA2 (*Forkhead box protein A2* o proteína A2 de caja de pinza) y TH (Kriks et al., 2011).

Más recientemente, se han desarrollado varios protocolos que enfatizan el uso de moléculas de la familia LDN, son moléculas pequeñas capaces de inhibir la señalización SMAD mediada por la proteína morfogenética ósea (BMP) para generar una inhibición dual modificada de la vía SMAD en conjunto con la activación de la señalización de SHH y WNT para mejorar la eficiencia y diferenciación de neuronas DAm (Chambers et al., 2012; Oh, 2019). En esta línea de trabajo, el grupo de Fedele y colaboradores utilizó un protocolo similar para generar cultivos de neuronas DA usando células de la PP, debido a que estos progenitores homogéneos retienen un potencial dopaminérgico eficiente en múltiples pasajes, pueden criopreservarse y especificarse sin la necesidad de partir desde CTP hacia

un fenotipo neuronal maduro. Mediante esta metodología se puede alcanzar hasta un 80% de células TH<sup>+</sup>, con cultivos celulares que exhiben una alta sobrevivencia, producción de dopamina y propiedades electrofisiológicas similares a las neuronas DAs nigroestriatales (Fedele et al., 2017).

## **1.2 Antecedentes**

### **1.2.1 Las células troncales pluripotentes en la EP**

Como se describió anteriormente, la EP es un trastorno neurodegenerativo cuya patología central es la pérdida de las neuronas DAm. Hasta ahora no existe un tratamiento que detenga la neurodegeneración, por ello, un tratamiento potencial es la terapia de reemplazo celular. Este enfoque consiste en el trasplante de células que produzcan de manera más eficiente y localizada la dopamina faltante dentro del núcleo estriado (Barker et al., 2015; Boronat-García et al., 2016). En los últimos 50 años se han desarrollado estudios preclínicos centrados en el trasplante en el estriado de diversos tipos celulares, tales como el de las células de la médula suprarrenal, células del epitelio pigmentario de la retina, células troncales de la matriz del cordón umbilical (gelatina de Wharton) (Weiss et al., 2006, Kang et al., 2013), células del cuerpo carotideo, tejido mesencefálico ventral fetal humano (hfVM), CTEh y CTPih (Barker et al., 2015). Cabe aclarar que sólo las últimas tres fuentes celulares son capaces de diferenciarse en verdaderas neuronas DAm *in vitro* (Barker et al., 2015). Adicionalmente, los trasplantes de hfVM realizados en pacientes con EP generaron resultados en buena parte satisfactorios. Los resultados obtenidos demostraron beneficios clínicos en ensayos abiertos de fase I, mejorando la sintomatología y la disminución del uso de medicamento en la EP (Barker et al., 2015; Lindvall et al., 1989, 1990; Piccini et al., 2000; Widner et al., 1992). Sin embargo, existe controversia en torno a este enfoque, ya que algunos pacientes presentaron discinesias inducidas por el injerto. Adicionalmente, el diseño experimental y la selección de pacientes no fueron las más apropiadas, por lo que actualmente se sigue estudiando la factibilidad de los trasplantes y su uso

terapéutico (Barker and Kuan, 2010; Hagell et al., 2002; Ma et al., 2002; Singh et al., 2007b).

Posteriormente a los ensayos clínicos realizados con tejido hfVM, se desarrollaron otras fuentes celulares con el objetivo de resolver la problemática de disponibilidad de tejido y las cuestiones éticas inherentes al uso de tejido fetal humano, siendo una de ellas el uso de CTP; una alternativa que ha destacado debido a la capacidad para producir linajes definidos como el dopaminérgico mesencefálico. A lo largo de los años, varios grupos de investigación han desarrollado diversos protocolos para la producción de neuronas DAm altamente funcionales, las cuales se han trasplantado desde etapas avanzadas de progenitores de PP y en estadios más diferenciados como neuroblastos DA y neuronas DAs inmaduras o completamente diferenciadas (Kim et al., 2020). En la búsqueda para determinar la etapa celular óptima para su uso en terapias de reemplazo de neuronas DAm *in vivo*, el trasplante de células en un estadio de diferenciación avanzada de PP, permitió observar un importante nivel de viabilidad, en comparación con etapas más avanzadas donde las neuronas son demasiado maduras para ser eficientes debido a la muerte celular y falta de integración en el tejido hospedero (Doi et al., 2014; Kim et al., 2020; Kirkeby et al., 2017). De manera que, los antecedentes indican que es posible desarrollar de manera eficiente el cultivo de progenitores DAM, los cuales al ser trasplantados son capaces de diferenciarse en neuronas DAm funcionales y mejorar las anomalías motoras complejas en modelos animales de la EP (Ganat et al., 2012; Kim et al., 2020; Kriks et al., 2011; Steinbeck and Studer, 2015).

El trasplante de neuronas DAs derivadas de CTEh y CTPIh se ha probado en varios modelos de la EP y, actualmente, los estudios preclínicos en primates no humanos muestran la supervivencia y funcionabilidad a largo plazo del trasplante, lo que da indicio de que la implementación futura de estos protocolos en estudios clínicos es factible (Barker et al., 2017; Hallett et al., 2015; Kikuchi et al., 2017). El primer estudio clínico empleando CTPIh se realizó en el año 2018 en Japón (Takahashi, 2017). Takahashi y colaboradores desarrollaron un protocolo para generar precursores de neuronas DA derivadas de CTPIh que fueron trasplantadas en el putamen de pacientes con EP (Takahashi, 2017; Parmar et al., 2020). El trasplante

de células se llevó a cabo con éxito a finales de 2021 en siete pacientes. El seguimiento indica que hasta el momento, no se han desarrollado complicaciones, y ninguno de los pacientes ha experimentado efectos adversos significativos. El estudio aún se encuentra en curso y se prevé que los resultados estén disponibles en 2024 (CiRA Annual Report 2022, n.d.). Por su parte, muy recientemente, el grupo de Schweitzer reportó la implantación de precursores dopaminérgicos mesencéfalicos, derivados de CTPih del propio paciente (trasplante autólogo) con EP idiopático. Las células fueron implantadas en el putamen, primeramente, en el hemisferio izquierdo, y 6 meses después en el hemisferio derecho. Interesantemente, la tomografía por emisión de positrones con el uso de flúor-18-L-dihidroxifenilalanina sugirió la supervivencia del injerto. Además, los parámetros clínicos de los síntomas de la EP después de la cirugía se estabilizaron o mejoraron entre 18 y 24 meses después de la implantación (Schweitzer et al., 2020). La gran ventaja que ofrece este tipo de trasplante autólogo es la de no requerir de inmunosupresión. La investigación en este campo continúa, y está encaminada en mejorar la supervivencia y funcionalidad de los trasplantes en los próximos ensayos clínicos.

### **1.2.2 La SNpc como sitio de trasplante celular para recuperar el circuito nigro-estriatal afectado en la enfermedad de Parkinson**

Uno de los desafíos que enfrenta la terapia de reemplazo celular en la EP es el desarrollo de protocolos eficientes para el trasplante celular, donde los precursores neuronales sean transplantados en regiones que propicien las condiciones para su diferenciación DA. La mayoría de los trasplantes de neuronas DAs se han realizado en el estriado, específicamente en el núcleo putamen, debido a que es la estructura de los ganglios basales donde se encuentra la depleción de dopamina en la EP al ser el sitio hacia donde proyectan y liberan la dopamina las neuronas DA de la SNpc (Freed et al., 2011). Sin embargo, se ha observado que este procedimiento, aunque en algunos casos genera beneficios en la recuperación de la actividad motora, tiene desventajas como la falta de restablecimiento funcional del circuito nigro-estriatal, siendo una de las consecuencias la generación de discinesias a causa de la falta



de regulación en la liberación de dopamina. Por ello, actualmente se intenta determinar si la SNpc puede ser una zona de implante celular alternativa al núcleo estriado para evitar este efecto secundario (Collazo-Navarrete et al., 2019; Ramos, 2018).

De esta manera, nuestro grupo de investigación evaluó el potencial del trasplante de CE obtenidos a partir de CTEr para diferenciarse a neuronas maduras en la SNpc (Maya-Espinosa et al., 2015). Los resultados obtenidos demostraron que la SNpc es un nicho neurogénico que provee un microambiente permisivo para la sobrevivencia y diferenciación del trasplante de CE a 6, 15 y 30 días postrasplante (dpt). De manera análoga, Grealish et al. demostraron la capacidad de las neuronas DAs derivadas de CTEh para diferenciarse y generar proyecciones axonales de hasta 10 mm desde el sitio de trasplante en la SNpc hacia el núcleo estriado, propiciando una inervación altamente específica desde el mesencéfalo hacia el prosencéfalo en el cerebro de ratas adultas (Barker et al., 2015; Grealish et al., 2014). A la par, nuestro grupo evaluó el trasplante de CE provenientes de CTEr en la SNpc intacta y lesionada con 6-OHDA y su potencial DA, observándose que a los 6 dpt una porción de las células de CE trasplantadas en el área lesionada eran capaces de expresar marcadores de un fenotipo neuronal como doblecortina, DA TH y Lxm1a, lo que sugiere que la SNpc pos-lesión mantiene su capacidad neurogénica (Collazo-Navarrete et al., 2019).

Posteriormente, en el laboratorio se analizó el potencial dopaminérgico a largo plazo del trasplante en la SNpc, pero ahora de CTEh en etapa de CE sobreexpresando los factores de transcripción mesencefálicos Lxm1a, FoxA2 y Otx2 en el modelo de la EP inducido por 6-OHDA. Como resultado se encontró que las células son capaces de sobrevivir y diferenciarse a través de la formación de rosetas neuronales y expresar marcadores de específicos de DA como Lmx1a y Otx2 a los 7 y 15 dpt, y a los 30 dpt de diferenciación DA (Ramos, 2018, Ramos-Acevedo et al., 2023).

### **1.2.3 Células trocales pluripotentes inducidas humanas con triplicación del gen *SNCA* como modelo de la enfermedad de Parkinson**

En el año 2009 se desarrolló una línea celular a partir de CTPIh derivadas de fibroblastos cutáneos provenientes de un paciente de 42 años con EP por triplicación del gen *SNCA* (3X *SNCA*) (Byrne et al., 2009). Posteriormente, varios grupos de investigación usaron este protocolo experimental como un modelo de la EP para estudiar las bases de la neurodegeneración causada por la proteína a-sin (Byers et al., 2011; Devine et al., 2011; Flierl et al., 2014; Oliveira et al., 2015). Los hallazgos encontrados en el cultivo de CTPIh con la 3X *SNCA* revelan acumulación de a-sin, así como incremento de marcadores de estrés oxidativo en comparación con una línea celular derivada de un familiar de primer grado no afectado (Byers et al., 2011). Al ser diferenciadas a precursores dopaminérgicos, estas células mostraron cambios sustanciales en su crecimiento, viabilidad y metabolismo energético, así como un envejecimiento acelerado y una menor sobrevivencia. La supresión de a-sin en la línea celular con la 3X *SNCA* mediante un ARN de horquilla corta (shRNA) expresado de manera estable, dio como resultado reversión de los cambios fenotípicos observados, concluyendo que esta mutación es capaz de influir directamente en la función neuronal *in vitro* (Flierl et al., 2014).

Con el objetivo de estudiar los efectos de la a-sin en la diferenciación DA, Byers et al. estimularon la diferenciación neuronal de CTPIh portadoras de la 3X *SNCA* mediante un protocolo de roseta neural, obteniendo como resultado neuronas TH<sup>+</sup> correspondientes a un fenotipo neuronal DAm (Byers et al., 2011). Por su parte, el grupo de Devine et al., sometió CTPIh con 3X *SNCA* a un protocolo de diferenciación DA a través del uso de moléculas pequeñas. En este caso, los cultivos mostraron una robusta expresión de TH y  $\beta$ -tubulina de clase III ( $\beta$ -III tubulina), marcadores de identidad neuronal DAm (Devine et al., 2011). Sin embargo, otros estudios demuestran que la sobreexpresión de a-sin disminuye la diferenciación neuronal *in vitro*, debido a que los cultivos de neuronas derivadas de la línea celular 3X *SNCA* muestran baja expresión de marcadores asociados al desarrollo neuronal como GABABR2, NURR1 y TH (Oliveira et al., 2015). De

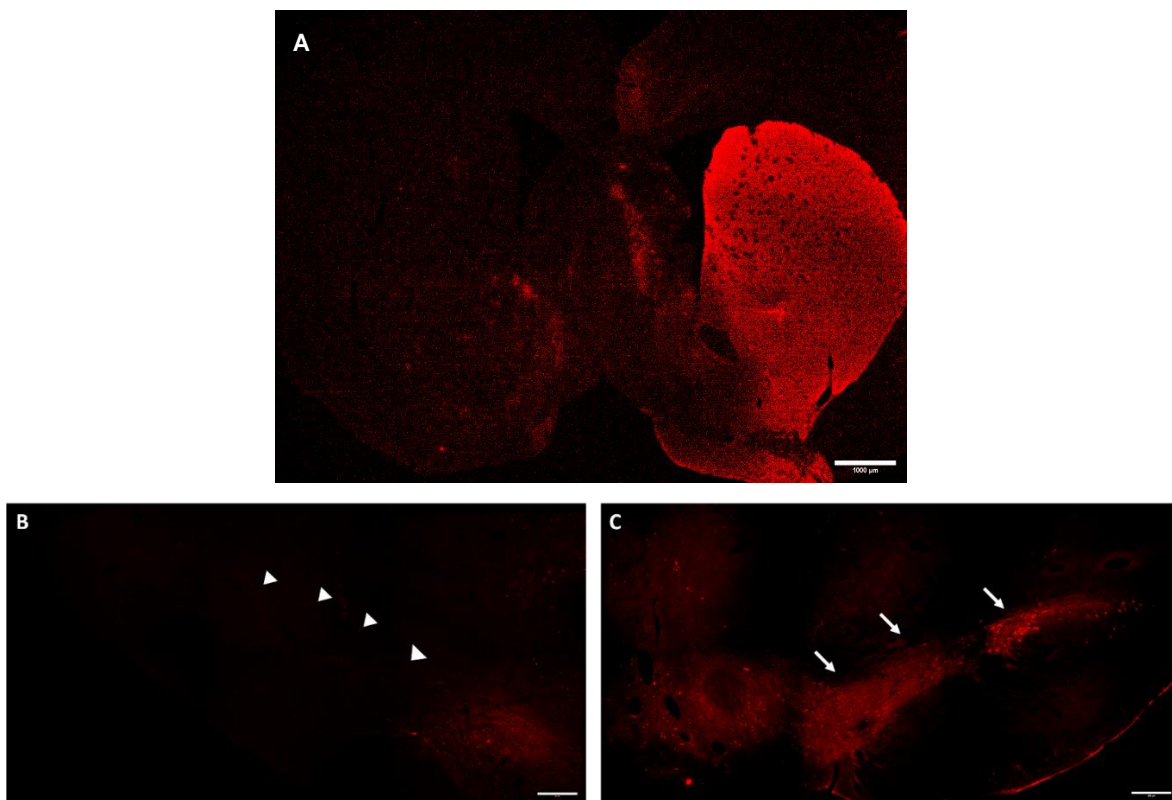
manera similar, se ha reportado que en cultivos primarios de neuronas DAs de ratón, la expresión de marcadores como Pitx3, NURR1, TH, Vmat2 y DAT asociados a la diferenciación DA es baja, en comparación donde no hay sobreexpresión de a-sin inducida a través de un vector viral (Volakakis et al., 2015).

Por otro lado, para tener mayor entendimiento sobre los efectos de la sobreexpresión y la ausencia de la 3X *SNCA*, nuestros colaboradores de la Universidad de Stanford generaron a partir de la línea celular de Byers et al., (Byers et al., 2011), una línea celular knockout isógena del gen *SNCA*. Para ello usaron la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9 para introducir rupturas de doble cadena en el primer exón codificante del gen *SNCA*. Posteriormente, se llevó a cabo la inducción de la diferenciación DA de la línea celular KO *SNCA*. Los resultados obtenidos mostraron expresión positiva de FoxA2 y Nestina, marcadores correspondientes a un fenotipo neural de PP. De igual forma, la expresión de TH se decrementó al final del protocolo, lo cual se atribuye a la falta de expresión de a-sin (Zafar et al., 2015). Finalmente, a pesar de que el papel fisiológico de a-sin aún no está claro, hay estudios que reportan cambios significativos en el número de células TH<sup>+</sup> en la SN durante el periodo de desarrollo embrionario E10.5 y E13.5 de ratones *knock-out* (KO) para el gen *SNCA*, concluyendo que la inactivación de a-sin, al igual que la sobreexpresión, puede conducir a la reducción de neuronas DAM (Garcia-Reitboeck et al., 2013; Tarasova et al., 2018). Actualmente, se necesitan más estudios para determinar si la deficiencia de a-sin puede ocasionar un efecto en la diferenciación de células de PP en este fenotipo.

#### **1.2.4 CTPih y su estudio en el laboratorio a través de trasplantes en la SNpc**

En el laboratorio se encuentra estandarizado el modelo de lesión de 6-OHDA (Collazo-Navarrete et al., 2019). En un trabajo de tesis de maestría realizado en el laboratorio por el M. en C. Daniel Bernal-Conde, en el que colaboré de manera muy importante durante mi servicio social, se inició el estudio de la diferenciación de las CTPih en la SNpc. Para ello, se llevó a cabo la lesión del sistema nigro-estriatal con 6-OHDA en el hemisferio izquierdo y se comprobó la degeneración de las neuronas

DA, a través de inmunofluorescencias para detectar la expresión de la enzima TH (Bernal-Conde, 2020). A la par, se utilizaron controles de lesión en los que sólo se inyectó solución salina. En la Figura 4, se observa un corte coronal de encéfalo en la región del núcleo estriado (A) y la SNpc (B), donde el hemisferio izquierdo muestra una denervación de la vía nigroestriatal, que es evidente por la nula expresión de TH (señal color rojo), en comparación con el lado contralateral donde se observa señal de TH en el hemisferio derecho (C), lo que indica una correcta lesión inducida por 6-OHDA (Bernal-Conde, 2020). En este trabajo de tesis se empleó ese tejido para analizar cualitativamente si CTPIh son capaces de diferenciar al fenotipo TH<sup>+</sup> en la SNpc cuando son trasplantadas en etapa de PP y comparar dicho potencial de diferenciación con el de células con la 3X SNCA y células que no expresan a-sin.



**Figura 4. Degeneración de la vía nigroestriatal.** Imágenes representativas del (A) núcleo estriado donde se observa la denervación de la vía nigroestriatal del hemisferio izquierdo ipsilateral al sitio de la lesión por 6-OHDA, evaluada por la expresión de tirosina hidroxilasa (TH, señal roja). La imagen se superpone al campo claro para delimitar los hemisferios cerebrales; aumento 1.5X, barra de escala 1000  $\mu$ m. (B) Lesión con 6-OHDA en la SNpc, se observa de igual manera la ausencia de la expresión de TH en el sitio donde surge la

vía nigroestriatal (triángulos blancos). **(C)** Expresión de TH en la SNpc contralateral a la lesión (flechas blancas), la señal también se observa en el núcleo estriado (**A**, lado derecho y **C**), lo que indica la integridad de esta vía (**B** y **C**); amplificación 10X, barra de escala 250  $\mu$ m. Tomada de (Bernal-Conde, 2020).

### 1.3 Justificación

La EP es una condición neurodegenerativa que representa un problema de salud pública. Actualmente, la relevancia de la a-sin en el desarrollo de la EP es considerada un área prioritaria de estudio a nivel internacional. Por ello, es muy importante el desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* que permitan el estudio de la EP, y que conduzcan a describir su etiología, así como la identificación de elementos clave que permitan el diagnóstico, diseño de medicamentos y la terapia celular. Para cumplir este objetivo, las CTPih generadas a partir de reprogramación celular a partir de fibroblastos dérmicos provenientes de pacientes cuyo genoma contiene mutaciones, duplicaciones o triplicaciones del gen *SNCA* (así como otros genes) que generan la EP constituyen una herramienta muy útil. Las CTPih con 3X *SNCA*, al ser inducidas a un protocolo de diferenciación DAm, permiten modelar los hallazgos histopatológicos similares a los que se observan en la EP, a su vez que permiten estudiar cómo la a-sin influye en el desarrollo del fenotipo DAm. Existen estudios que demuestran cómo la sobreexpresión de a-sin afecta el mantenimiento del fenotipo de neuronas DAm maduras y de neuroblastos DA provenientes de CTPih *in vitro*, lo cual sugiere que la a-sin ejerce un efecto modulador en la diferenciación terminal de neuronas DA. Sin embargo, se desconoce cuál es el papel de la sobreexpresión de a-sin en la diferenciación en etapas tempranas del desarrollo del fenotipo DAm, tales como la fase de PP. Esta investigación tiene como objetivo precisamente estudiar la capacidad de las CTPih para diferenciar al linaje TH<sup>+</sup> en su sitio de origen ontogenético, la SNpc, al ser trasplantadas en una etapa de diferenciación muy temprana de PP, para así conocer su potencial uso en terapias de reemplazo celular, en una etapa en la que su integración puede ser más eficiente. Además, que nos permita acercarnos al entendimiento del efecto que tiene la a-sin en la diferenciación DAm *in vivo* a través del empleo de un modelo genético de la EP de CTPih con 3X *SNCA*.

#### **1.4 Pregunta de Investigación**

¿Las CTPIh con una cantidad génica normal de  $\alpha$ -sin, con 3X *SNCA* o KO para el gen *SNCA* trasplantadas en la SNpc en fase de PP, podrán sobrevivir y desarrollar un fenotipo TH<sup>+</sup> *in vivo* en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson?

#### **1.5 Hipótesis**

Las CTPIh con una dosis génica normal de  $\alpha$ -sin trasplantadas en la SNpc en etapa de PP tendrán la capacidad de sobrevivir y de diferenciar hacia un fenotipo TH<sup>+</sup> a largo plazo, mientras que ambos potenciales estarán disminuídos en la línea con 3X *SNCA* y KO *SNCA*.

#### **1.6 Objetivo general**

Analizar cualitativamente si las CTPIh tienen la capacidad de sobrevivir y diferenciar a un fenotipo TH<sup>+</sup> *in vivo*, al ser trasplantadas en la etapa de PP en un modelo *in vivo* de la EP a largo plazo. Así mismo comparar si la sobreexpresión de  $\alpha$ -sin en CTPIh con 3X *SNCA* y la ausencia de  $\alpha$ -sin en CTPIh KO para *SNCA* modifica ese potencial.

#### **1.7 Objetivos particulares**

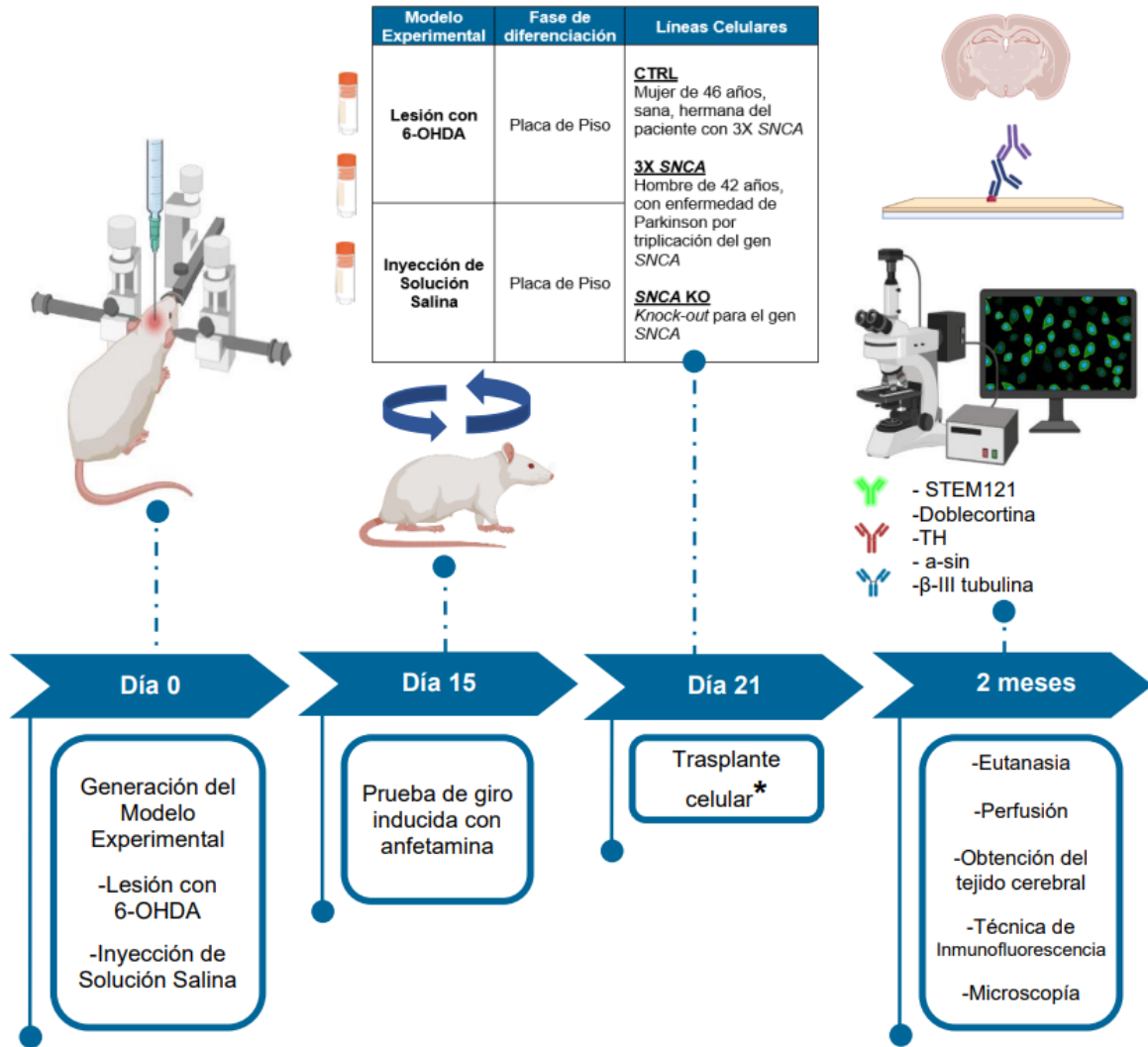
1. Determinar si las CTPIh CTRL, 3X *SNCA* y KO *SNCA* sobreviven y diferencian hacia el fenotipo neuronal y TH<sup>+</sup> en la SNpc sin lesión y con lesión de 6-OHDA a 2 meses postrasplante.
2. Evaluar si la expresión de  $\alpha$ -sin modifica la capacidad de sobrevivencia y/o de diferenciación de las diferentes líneas de CTPIh *in vivo*.

## CAPÍTULO 2: ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 2.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental se describe en la Figura 5. De manera general, al día 0 se generaron dos modelos experimentales en las ratas: Lesión con 6-OHDA (como modelo unilateral de la EP) e inyección de solución salina (SS) al 0.9 % (como control de daño mecánico e hidrostático y compararlo con la lesión). Posteriormente, al día 15, al grupo de lesión con 6-OHDA se le realizó la prueba de giro inducido con amfetamina según lo descrito por Bové & Perier (2012) para determinar si la SNpc había sido lesionada correctamente. Las ratas que dieron más de 400 giros ipsilaterales a la lesión fueron trasplantadas al día 21 con una de las tres líneas celulares. Se esperaron 3 semanas para realizar el trasplante para que las reacciones inflamatorias producidas por la lesión se encuentren disminuidas, y no afecten al trasplante celular. Finalmente, a los 2 mpt las ratas fueron sujetas a eutanasia y perfundidas para la obtención de los cerebros. A los tejidos cortados con criostato se les realizó la técnica de inmunofluorescencia para diferentes marcadores que nos permitían identificar a las células trasplantadas (STEM121), a neuroblastos (doblecortina), neuronas jóvenes (doblecortina,  $\beta$ -III tubulina), neuronas del linaje dopaminérgico (TH) y a  $\alpha$ -sin. Los tejidos fueron analizados a través de imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia y confocal. El detalle de cada metodología se describe a continuación.





\*Se inicia un protocolo de inmunosupresión desde el día anterior al trasplante y hasta un día previo a la perfusión.

**Figura 5. Línea temporal del diseño experimental.** Se generó la lesión con 6-OHDA o la administración de solución salina en ratas control. A los 15 días posteriores a la lesión, se realizó la prueba de giro con amfetamina y se seleccionaron aquellas ratas lesionadas para el trasplante de la línea celular al día 21 del protocolo experimental. El procesamiento del tejido fue mediante una técnica de inmunofluorescencia para los marcadores: STEM121, doblecortina, β-III tubulina, TH y a-sin.

## 2.2 Cultivo de células troncales pluripotentes inducidas humanas

Se utilizaron 3 líneas de CTPih. Una línea CTRL, la línea 3X SNCA y la línea SNCA KO fueron donadas por nuestra colaboradora la Doctora Birgitt Schüle de la Universidad de Stanford, quien es parte del grupo propietario de la patente, con clave US8669048B2S. Las tres líneas celulares fueron sometidas a diferenciación

dirigida hacia células de PP, mediante el protocolo “PSC Dopaminergic Neuron Differentiation Kit” (Guide, 2016; Schuele et al., 2016; Zafar et al., 2015) el cual proporciona condiciones de cultivo reproducibles y es normalmente utilizado en el laboratorio. Las células fueron cultivadas en el Laboratorio AL-201 del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por el M. en C. Daniel-Bernal Conde durante el desarrollo su tesis de Maestría. Se generó un banco de células que permitiera la realización de los experimentos.

### 2.3 Animales

Se emplearon un total de 39 ratas macho adultas de la cepa Wistar, de 230-250 g, las cuales fueron mantenidas bajo un ciclo de 12 h luz/oscuridad (luces encendidas a las 7:00 am), a una temperatura controlada (22°C) y acceso *ad libitum* a comida y agua. Los procedimientos experimentales realizados fueron conducidos de acuerdo con los principios bioéticos establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animal de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular con el número de autorización MGC08-14.

### 2.4 Grupos de estudio

La **Tabla 1** muestra la distribución de los grupos estudiados.

Modelo	Duración del trasplante	Fase de diferenciación	No. de ratas trasplantadas con cada línea celular		
			CTRL	3X SNCA	SNCA KO
<b>Solución salina al 0.9%</b>	2 meses	Placa de Piso	5 ratas	5 ratas	5 ratas
<b>Lesión con 6-OHDA</b>	2 meses	Placa de Piso	8 ratas	8 ratas	8 ratas

**Tabla 1. Número de ratas totales en las que se realizó el trasplante de CTPih.**

## **2.5 Lesión del sistema nigro-estriatal con 6-hidroxidopamina**

Para generar un modelo unilateral de la EP, un grupo de ratas fueron inyectadas con 6-OHDA tres semanas previas al trasplante celular. Los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina/xilacina (87 mg / 13 mg/kg, respectivamente) (Pisa Agropecuaria, México) por vía intraperitoneal. Posteriormente, las ratas fueron colocadas en un aparato de cirugía estereotáxica para inyectar la 6-OHDA que fue estabilizada con 32  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de L-ascorbato en un volumen total de 0.5  $\mu\text{l}$  de solución salina, y administrada a una velocidad de 0.125  $\mu\text{l}/\text{min}$ , en el hemisferio izquierdo en la SNpc (anteroposterior 4.8; lateral 1.6; ventral 8.1) (Paxinos and Watson, 2007). A otro grupo de ratas empleadas como control se les inyectó únicamente el mismo volumen de solución salina (SS) al 0.9%.

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

Para verificar si la vía nigroestriatal había sido lesionada correctamente, las ratas fueron sometidas a los 15 días pos-lesión a una prueba de giro con la inyección intraperitoneal de 4 mg/kg de anfetamina, un agonista dopaminérgico que se une a los receptores presinápticos e induce la conducta de giro estereotipada (Boronat-García et al., 2016). Se cuantificaron durante 90 minutos el número de giros ipsilaterales a la lesión a través del software Matlab, y sólo se seleccionaron las ratas con más de 400 giros para conformar el grupo de la lesión con 6-OHDA.

## **2.7 Trasplante celular**

El trasplante de cada línea celular se realizó una semana posterior a la prueba de giro mediante el mismo método y coordenadas estereotáxicas usadas para la inyección de 6-OHDA. Las células fueron introducidas en un volumen de 0.5  $\mu\text{l}$  de PBS seguidos de 120,000 células disueltas en 3-4  $\mu\text{l}$  de DPBS en una jeringa Hamilton (Thomas Scientific, 8929C51) e inyectadas durante 1 minuto. La cánula se mantuvo en el sitio durante 6 minutos adicionales para que las células descendieran en su totalidad y al finalizar se retiró lentamente para prevenir cualquier flujo retrógrado.

## 2.8 Inmunosupresión

Se realizó un protocolo de inmunosupresión para evitar una reacción de rechazo por el sistema inmune de las ratas hacia el trasplante. Desde un día previo al trasplante celular y hasta un día anterior a la eutanasia, se les dosificó diariamente a los animales 100 mg/kg/día de Ciclosporina A (10 mg/ml) (Cyclosporin, Alphachem) vía oral (0.1 mL diluido en 750 mL de agua).

## 2.9 Obtención del tejido cerebral

Después de 2 mpt, se les dio muerte a los animales mediante una inyección letal de pentobarbital sódico (60 mg/kg, Pisabental) vía intraperitoneal. Para lavar y fijar el tejido, cada rata fue perfundida vía intracardiaca con 200 mL de buffer de fosfatos (PBS 0.1 M) seguido de 200 mL de paraformaldehído al 4% a 4 °C. Se procedió a extraer el cerebro de cada animal y se colocó en paraformaldehído al 4% durante 12 h. Posteriormente, se realizó un proceso de deshidratación (crioprotección), consistente en mantener los cerebros por un periodo de 3 días en soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30% respectivamente, durante 24 h a 4 °C en cada concentración. Finalmente, con un criostato se realizaron cortes coronales de encéfalo con un grosor de 40 µm. Los cortes se criopreservaron a -20 °C en una solución anticongelante (50% de PBS, 25% de glicerol y 25% de etilenglicol).

## 2.10 Inmunofluorescencia

Cada corte coronal fue sometido a 3 lavados de 1 mL de PBS durante 10 minutos y permeabilizado con 2 lavados en PBT (PBS y 0.3% Tritón 100x) el mismo periodo de tiempo. Posteriormente, fueron colocados en 1 mL de recuperador de antígenos 20X (PBS diluido) (Bio SB, BSB 0020) durante 35 minutos a 65 °C. Los cortes se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos, se les realizaron 3 lavados en PBT durante 5 minutos y se colocaron durante una 1 h en solución de bloqueo (PBT más 5% de albumina de suero bovino) (Sigma, 9048-46-8). Se procedió a diluir el anticuerpo primario (**Tabla 2**) en solución de bloqueo según las

recomendaciones del fabricante para cada tipo de anticuerpo. Los cortes se mantuvieron durante toda la noche en dicha preparación a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos se sometieron a 3 lavados de 10 minutos en PBS y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (**Tabla 2**) correspondiente. Al concluir el periodo de incubación, a los cortes se les realizó un lavado de 5 minutos en PBS, se colocaron en DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, 1:10,000) para teñir el núcleo celular y se les realizó un último lavado de 5 minutos en PBS. Los tejidos fueron montados en portaobjetos y cubreobjetos Superfrost (Thermo Fisher Scientific) aptos para microscopia y usando ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen, P36970) como solución de montaje.

Anticuerpos primarios	Marca	Huésped	Dilución	Uso
STEM121 (SC121)	Takara	Ratón	1:500	Detecta un antígeno humano, por lo que reconoce a las CTPih trasplantadas
Tirosina hidroxilasa (TH)	Merck Millipore	Ratón	1:500	Reconoce a la enzima TH, un marcador fundamental de neuronas DA tempranas y maduras
Doblecortina (DCX)	Santa Cruz Biotechnology	Cabra	1:250	Reconoce a la proteína de citoesqueleto neuronal DCX, característica de neuroblastos y neuronas inmaduras
Alfa-sinucleína (a-sin)	BD biosciences	Ratón	1:150	Reconoce a la proteína a-sin nativa
Tubulina (β-III tubulina)	Biolegend	Ratón	1:500	Reconoce a la proteína constituyente de microtúbulos β-III tubulina,

				característica de un fenotipo neuronal inmaduro
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Marca</b>	<b>Huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Uso</b>
Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Inc.	Burro	1:1000	Anti-ratón IgG
Alexa Fluor 594	Jackson ImmunoResearch Inc.	Burro	1:1000	Anti-conejo IgG
Alexa Fluor 568	Invitrogen	Burro	1:400	Anti-cabra IgG

**Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunofluorescencia.** Se muestran los anticuerpos usados para evaluar la diferenciación neuronal y del linaje DA en el trasplante celular.

### 2.11 Microscopía

Las imágenes del tejido fueron capturadas usando un microscopio confocal (Zeiss LSM800, microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fónico) y un microscopio de epifluorescencia Leica DM6000B. Se utilizó el software ImageJ/FIJI para procesar las imágenes.

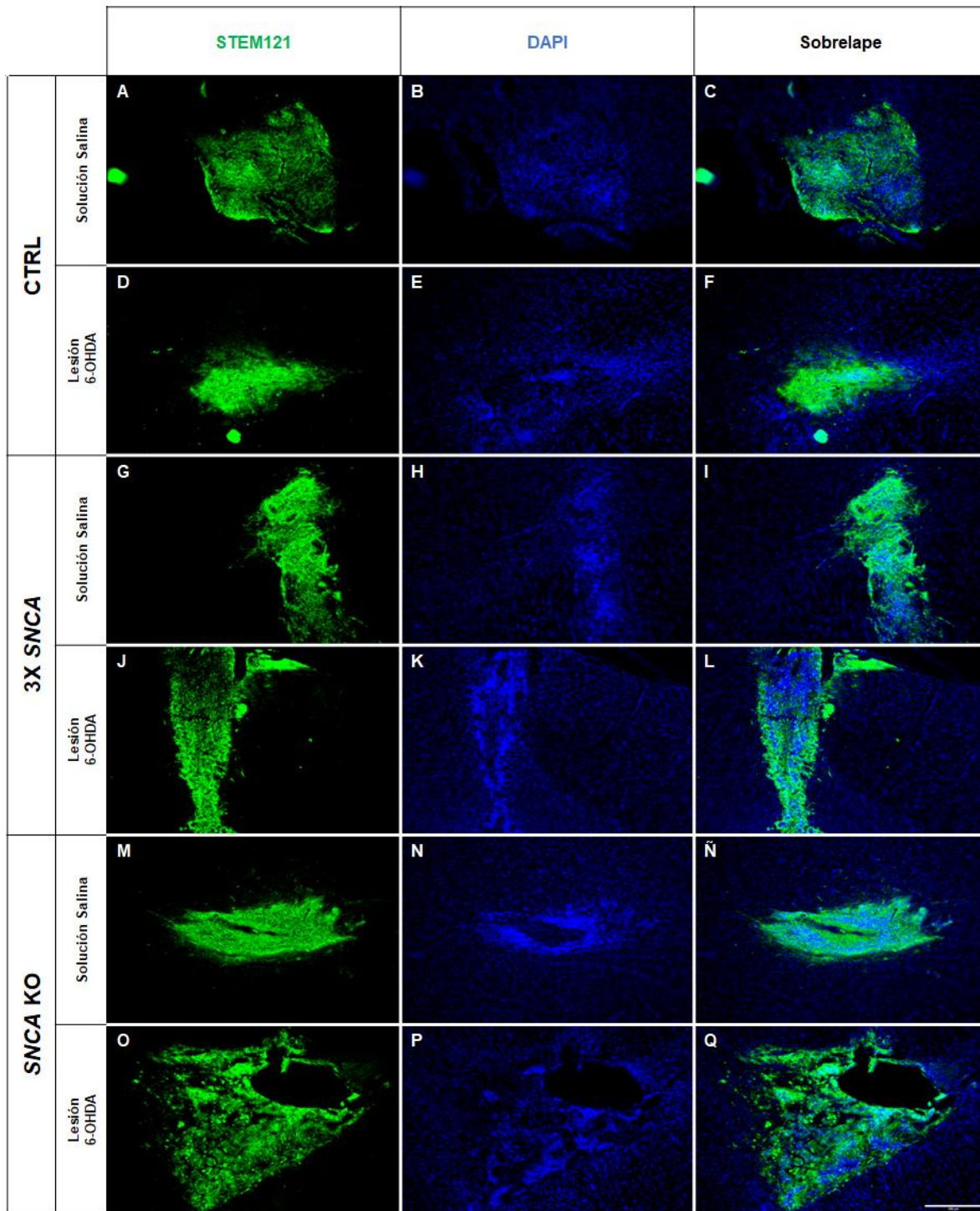
## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Las células troncales pluripotentes inducidas humanas trasplantadas en etapa de placa de piso son capaces de sobrevivir en la Sustancia Nigra pars compacta a 2 meses postrasplante

Para determinar si las tres líneas de CTPih (CTRL, 3X SNCA y KO SNCA) en etapa de PP eran capaces de sobrevivir y desarrollar un fenotipo TH<sup>+</sup> *in vivo*, fueron trasplantadas en la SNpc, de ratas sin lesión química (administración de SS) y lesionadas con 6-OHDA.

Realizamos inmunofluorescencias para evaluar cualitativamente la sobrevivencia celular mediante el anticuerpo STEM121, el cual es específico para un antígeno presente en el citoplasma de células humanas; de esta forma nos fue posible detectar el marcaje de las células exógenas humanas pertenecientes al trasplante.

Observamos que las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de PP en la SNpc, ya sea en ratas lesionadas con 6-OHDA o control de lesión con SS, fueron positivas para STEM121 (STEM121<sup>+</sup>) a 2 mpt (**Figura 6**), lo que indica que las células trasplantadas lograron sobrevivir.



**Figura 6. Supervivencia de las tres líneas de CTPih trasplantadas en etapa de placa de piso en la SNpc a 2 meses postrasplante.** Micrografías representativas del trasplante de las líneas celulares CTRL (A-F), 3X **SNCA** (G-L) y **SNCA KO** (M-Q) en la SNpc de rata. La supervivencia celular se evaluó a 2 mpt, mediante el anticuerpo STEM121 a través de microscopía confocal (magnificación 10X); DAPI fue utilizado como tinción nuclear. Barra de escala = 250  $\mu$ m.



Por otro lado, en la **Tabla 3** se muestra que el grupo con el máximo porcentaje de ratas con sobrevivencia de células trasplantadas (80%), fue el de ratas control de lesión con SS trasplantadas con la línea celular 3X SNCA (n=5) (**Tabla 3**). Por el contrario, el mínimo porcentaje de ratas con encéfalos STEM121<sup>+</sup> fue de 37.5% (n=8), correspondiente al grupo de lesión con 6-OHDA trasplantado con la línea celular 3X SNCA (**Tabla 3**).

Modelo	Duración del trasplante	Fase de diferenciación	No. y % de ratas con sobrevivencia del trasplante por cada línea celular		
			Control	3X SNCA	SNCA KO
Solución salina al 0.9%	2 meses	Placa de Piso	3 ratas (n=5)	4 ratas (n=5)	3 ratas (n=5)
		Porcentaje de encéfalos con sobrevivencia de CTPIh (STEM121 <sup>+</sup> )	60%	80%	60%
Lesión con 6-OHDA	2 meses	Placa de Piso	3 ratas n=8	3 ratas n=8	4 ratas n=8
		Porcentaje de encéfalos con sobrevivencia de CTPIh (STEM121 <sup>+</sup> )	37.5%	37.5%	50%

**Tabla 3. Número y porcentaje de ratas que mostraban sobrevivencia a 2 mpt de los implantes celulares realizados en etapa de placa de piso en la SNpc de rata. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia en función del número de ratas con encéfalos STEM121<sup>+</sup>.**

Estos resultados en su conjunto nos indican que la triplicación del gen SNCA no interfiere en la sobrevivencia del trasplante celular en la fase de PP y que la SNpc de rata es permisiva para dicha sobrevivencia.

Posteriormente, para hacer grupos de estudio homogéneos, en este trabajo se analizaron de manera cualitativa, 3 diferentes animales trasplantados con cada línea celular (**Tabla 4**). En cada uno de ellos se analizaron cualitativamente diferentes marcadores de diferenciación, correspondientes a un fenotipo neuronal inmaduro (usando los anticuerpos doblecortina (DCX) y  $\beta$ -III tubulina), y dopaminérgico (a través del anticuerpo TH) a los 2 mpt. Para ello, analizamos los cortes adyacentes a los analizados para STEM121 (n = mínimo 3 cortes por grupo). No se pudo llevar a cabo la cuantificación de las células STEM121+, DCX+,  $\beta$ -III tubulina+, TH+ y  $\alpha$ -sin+, debido a la alta densidad de los cuerpos celulares y sus proyecciones, lo que dificulta una delimitación precisa del soma, e impide seguir la señal de cada uno de los marcadores.

Procedimiento experimental	Estadio de diferenciación celular	No. de ratas analizadas para cada línea celular		
		CTRL	3X SNCA	KO SNCA
<b>Lesión 6-OHDA</b>	Placa de Piso	3	3	3
<b>Control de solución salina al 0.9 %</b>	Placa de Piso	3	3	3
Suma total:			18 ratas	

**Tabla 4.** Distribución de los grupos de estudio analizados para los diferentes marcadores de progresión de diferenciación DA.

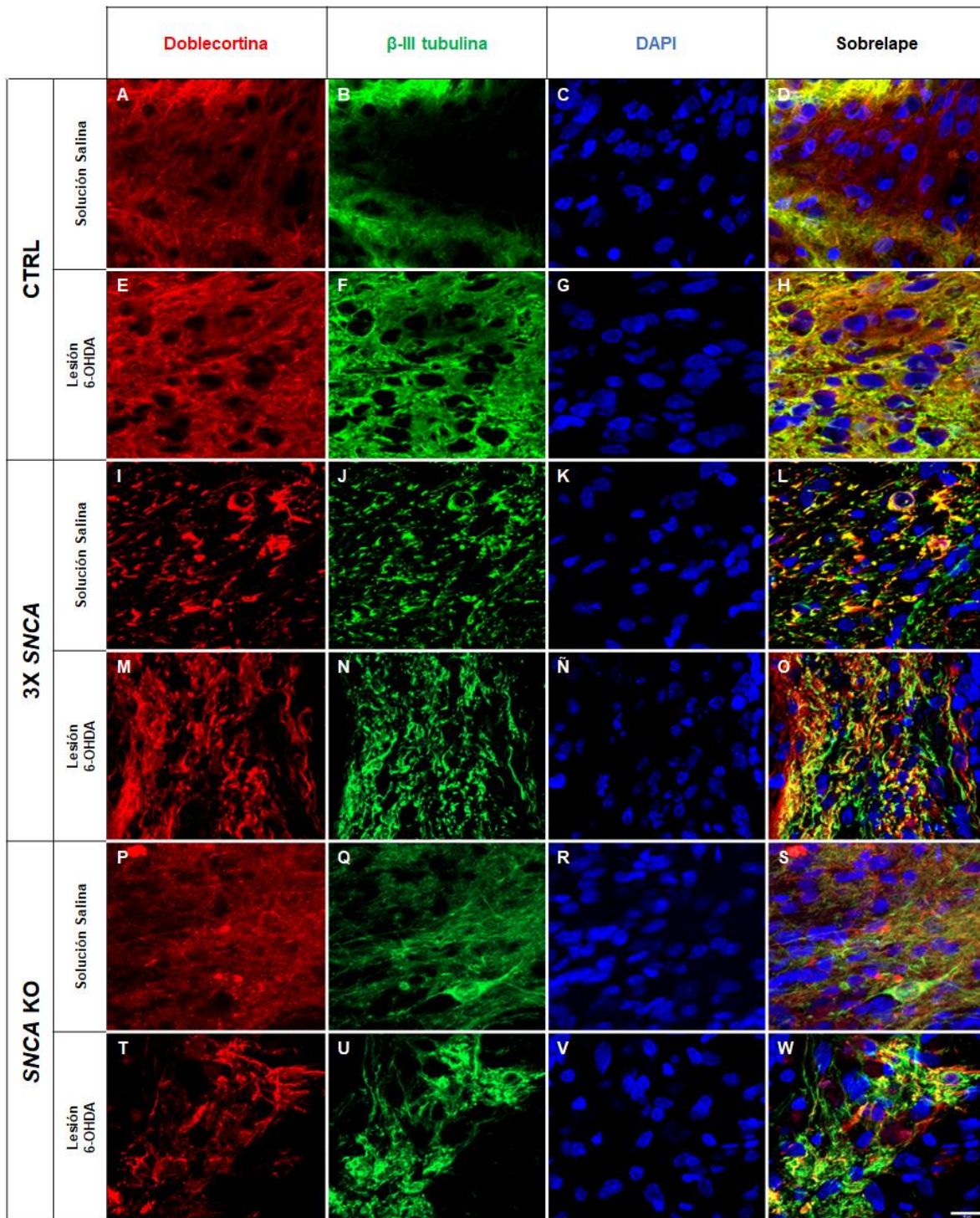
### **3.2 Las células troncales pluripotentes inducidas humanas trasplantadas en etapa de placa de piso expresan un fenotipo neuronal inmaduro en la SNpc a 2 meses postrasplante**

Para evaluar si las CTPIh trasplantadas en etapa de PP a 2 mpt en la SNpc lesionada con 6-OHDA y en el control de lesión con SS eran capaces de diferenciarse a neuroblastos y neuronas inmaduras, se utilizó el marcador

doblecortina, una proteína de citoesqueleto (Zhang and Jiao, 2015) propia de estos fenotipos. También analizamos la expresión de la proteína constituyente de microtúbulos  $\beta$ -III tubulina que se expresa en neuronas inmaduras y maduras. Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron tres cortes por cada grupo, los cuales habían sido seleccionados por su positividad para STEM121 (**Figura 6**), y se analizaron mediante la técnica de inmunofluorescencia de doble marcaje para DCX/ $\beta$ -III tubulina (**Figura 7**).

A través de microscopía confocal observamos que estos marcadores se expresan a 2 mpt en las tres líneas celulares, aunque en diferente proporción para cada línea de CTPih (**Figura 7**). De manera interesante, se observó que en la línea celular 3X SNCA, la expresión de DCX y  $\beta$ -III tubulina se encuentran disminuidas, tanto en las células trasplantadas en la SNpc con SS (**Figura 7I-L**) como en el grupo lesión con 6-OHDA (**Figura 7M-O**), lo cual sugiere que la diferenciación de las células con sobreexpresión de a-sin tienen una diferenciación neuronal menos eficiente en comparación con la línea CTRL. De manera similar, la línea celular SNCA KO exhibe una expresión menor de DCX y  $\beta$ -III tubulina en la SNpc sin lesión (grupo SS) (**Figura 7P-S**) y lesionada con 6-OHDA, (**Figura 7T-W**). Sin embargo, se requiere realizar una cuantificación celular para conocer si existe una diferencia significativa en la expresión de estos marcadores entre las diferentes condiciones experimentales.

Estos resultados sugieren que la SNpc sin y con lesión de 6-OHDA es permisiva a la sobrevivencia y a la diferenciación neuronal de las tres líneas celulares trasplantadas en la fase de PP, pero que la diferenciación es menor en las células que sobreexpresan o carecen de a-sin.



**Figura 7. Expresión de doblecortina y  $\beta$ -III tubulina de las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de placa de piso a 2 meses postrasplante.** Micrografías representativas de las líneas CTRL (A-H), 3X SNCA (I-O) y SNCA KO (P-W). Las células trasplantadas en etapa de PP tienen un marcaje positivo para DCX y  $\beta$ -III tubulina a 2 mpt, tanto en la condición de lesión con 6-OHDA como en el control de lesión con SS. Se observa una menor expresión de DCX y  $\beta$ -III tubulina en las líneas celulares 3X SNCA (I-O) y SNCA

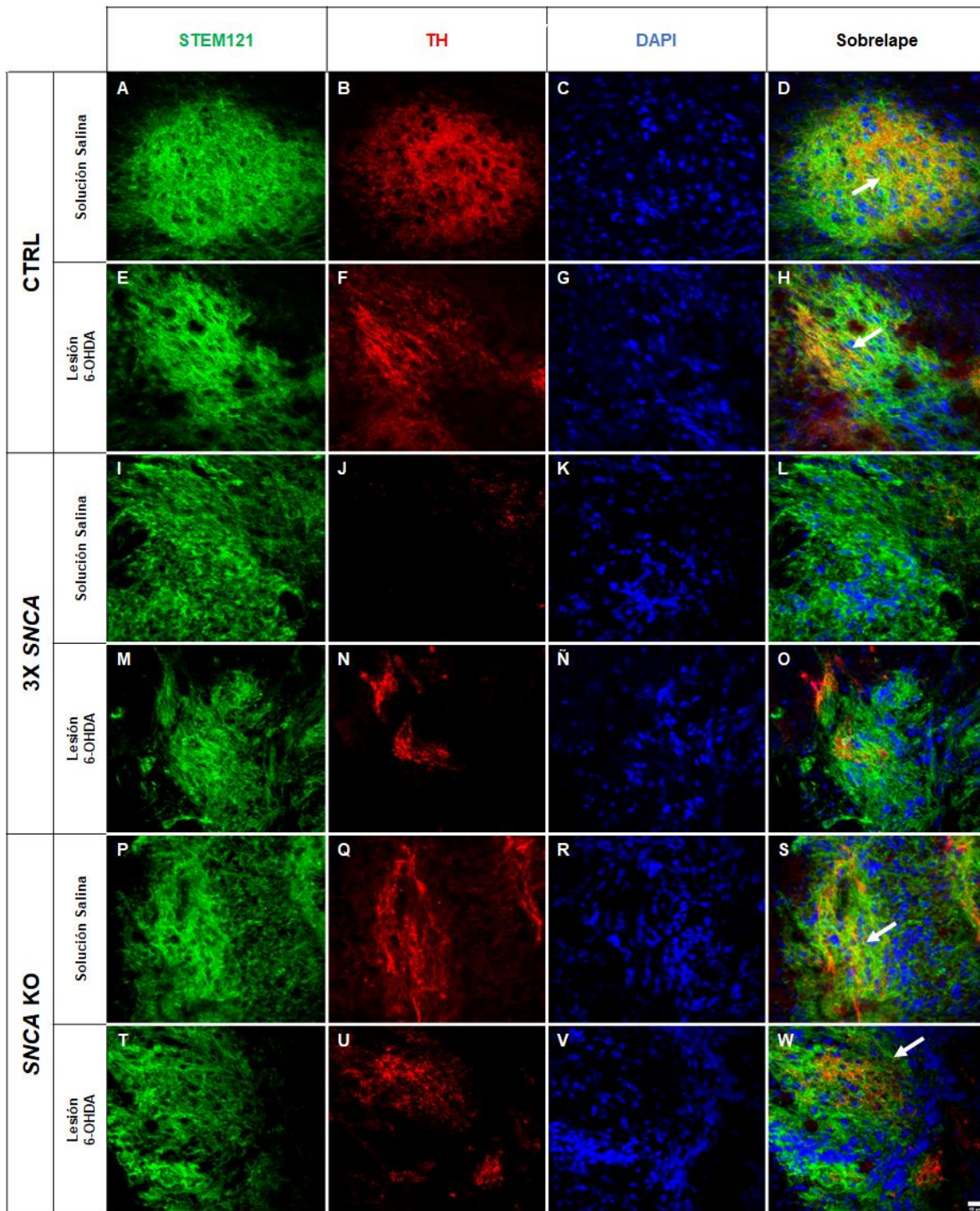
KO (**P-W**) trasplantadas en la SNpc control de lesión con SS y lesión de 6-OHDA. DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu$ m.

### **3.3 Las células trasplantadas en etapa de placa de piso expresan TH en la SNpc a 2 meses postrasplante**

Una vez que analizamos la expresión de marcadores característicos de un fenotipo neuronal inmaduro (DCX y  $\beta$ -III tubulina) en las tres líneas celulares (CTRL, 3X SNCA y KO SNCA), decidimos determinar si las células desarrollaron un fenotipo TH<sup>+</sup> a 2 mpt. La enzima TH, es un marcador fundamental en la caracterización de neuronas DA, al ser la enzima limitante en la síntesis de dopamina (Zhang and Jiao, 2015). Para ello, realizamos un doble inmunomarcaje para STEM121 y TH (**Figura 8**).

Observamos que las células trasplantadas en la etapa de PP de la línea CTRL y KO SNCA exhiben una señal TH positiva (panel rojo), que a su vez colocaliza con el marcaje de STEM121 (panel verde), por lo que estos resultados sugieren que ambas líneas celulares son capaces de expresar TH (**Figura 8D y H, S y W**, flechas blancas) en la SNpc tanto en el modelo de lesión 6-OHDA como en el control de lesión con SS. En contraste con la línea con 3X SNCA, observamos una baja expresión de TH en ambas condiciones experimentales (**Figura 8L y O**), lo cual puede estar relacionado con la presencia de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sin.

El marcaje más evidente se observó en línea celular CTRL, trasplantada en la fase de PP (**Figura 8X-Y**), sin embargo, desafortunadamente no pudimos realizar una cuantificación celular para determinar si existe una diferencia significativa en la expresión de TH en las condiciones evaluadas, debido a la alta densidad celular en las zonas del trasplante, lo que dificultó distinguir los somas de las células y por lo tanto la cuantificación celular.

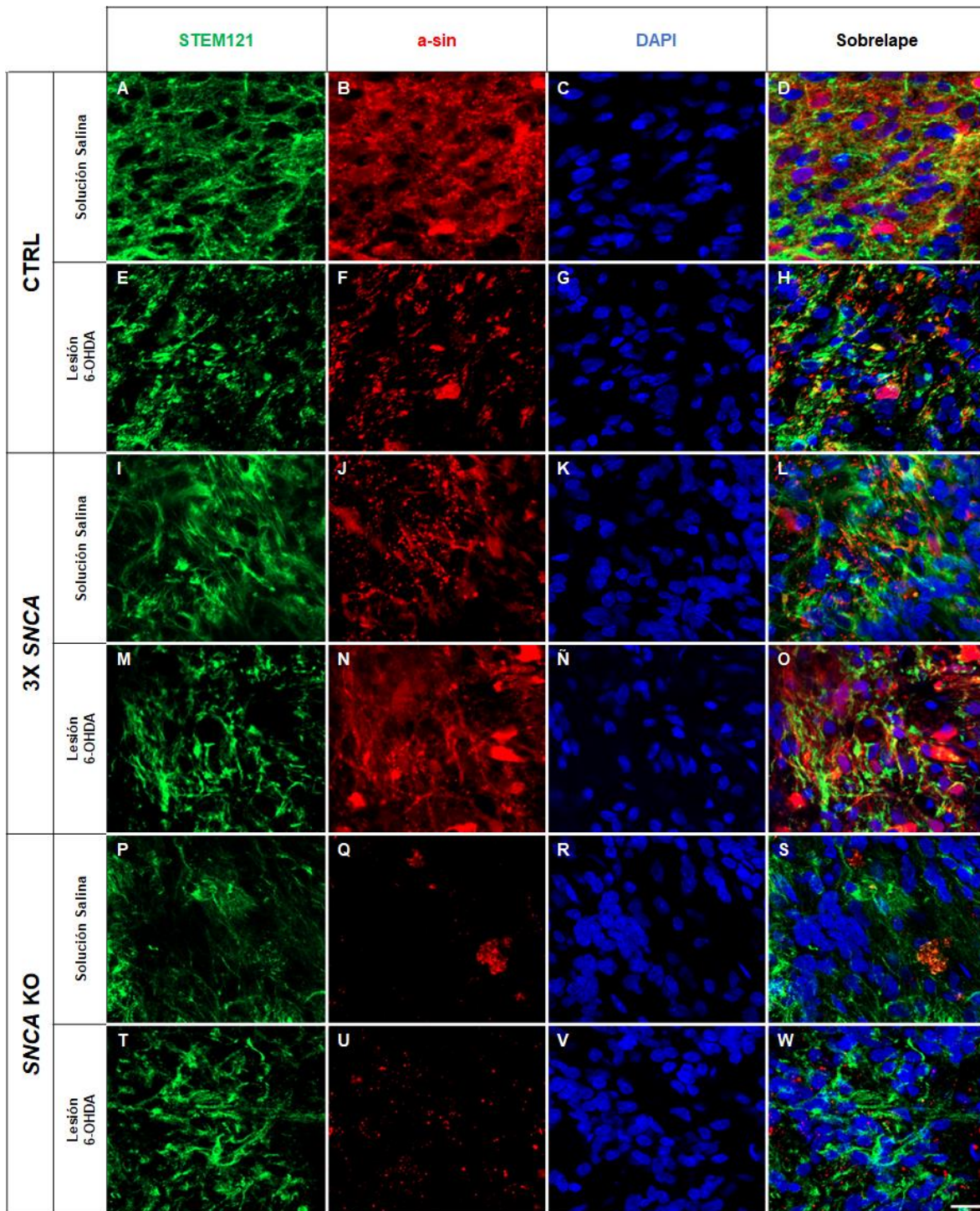


**Figura 8. Expresión de tirosina hidroxilasa de las tres líneas celulares a 2 meses postrasplante en etapa de placa de piso.** Imágenes representativas de las líneas CTRL (A-H), 3X SNCA (I-O) y SNCA KO (P-W). Se muestra la expresión de TH en las células trasplantadas en etapa de PP correspondientes a las líneas CTRL y SNCA KO en la SNpc en ambas condiciones (SS y lesión 6-OHDA). La línea 3X SNCA muestra una menor expresión de TH. Se empleó el marcador para células humanas STEM121 para identificar las células trasplantadas (panel verde), en las que se puede observar señal de TH (panel

rojo), y como ambas señales colocalizan en ciertas zonas (flechas blancas); DAPI como tinción nuclear, magnificación 63X, barra de escala 15  $\mu\text{m}$ .

### **3.4 La línea celular CTRL y 3X SNCA trasplantadas en etapa de placa de piso expresan alfa-sinucleína en la SNpc a 2 meses postrasplante**

Para determinar la presencia *in vivo* de la proteína a-sin en las líneas celulares trasplantadas en etapa de PP, analizamos el tejido mediante una técnica de doble inmunofluorescencia para los anticuerpos a-sin y STEM121, este último, como se mencionó anteriormente, con el objetivo de poder discernir entre la señal endógena y la proveniente del trasplante celular. En la **Figura 9**, se muestra que la línea CTRL (**B, D, F, H**) y 3X SNCA (**J, L, N, O**) expresan a-sin en etapa de PP a 2 mpt. En contraste, y conforme a lo esperado, las células de la línea KO SNCA no expresan a-sin, únicamente se observa la señal endógena de la SNpc (**Q, S, U, W**). De manera interesante, se observa que la línea 3X SNCA en la SNpc lesionada con 6-OHDA presenta un aparente incremento en el número de células con expresión de a-sin (**Figura 9 N, O**).



**Figura 9. Expresión de a-sin de las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de placa de piso a 2 meses postrasplante.** Micrografías representativas de las líneas CTRL (A-H), 3X SNCA (I-O) y KO SNCA (P-W). Las líneas celulares CTRL (B, D, F, H) y 3X SNCA (J, L, N, O) expresan a-sin en la SNpc sin lesión química y lesionada con 6-OHDA a 2 mpt. En contraste, en la línea celular KO SNCA (Q, S; U, W) no se observa expresión de a-sin, solamente se observa señal de la a-sin endógena en la SNpc. DAPI como tinción nuclear. Magnificación 63X, barra de escala = 15  $\mu$ m.



## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### **Sobrevivencia de CTPIh trasplantadas en etapa de placa de piso en la SNpc a 2 meses post-trasplante.**

Nuestro objetivo principal fue analizar la capacidad de CTPIh para sobrevivir a largo plazo y diferenciarse hacia el fenotipo de células TH<sup>+</sup> al ser trasplantadas en la etapa temprana de diferenciación DA de PP, en la SNpc lesionada con 6-OHDA y sin lesionar. Además, nos interesaba conocer esa misma capacidad pero de una línea de CTPIh derivada de un paciente con EP asociada a la 3X SNCA, con el fin de conocer el impacto de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sin en la diferenciación.

Los resultados obtenidos en este estudio destacan la permisividad de la SNpc de rata para la supervivencia de las células trasplantadas durante la fase de PP. Observamos que las tres líneas celulares trasplantadas lograron sobrevivir a 2 mpt, esto implica que el microambiente dentro de la SNpc es propicio para la supervivencia e integración de las células trasplantadas, independientemente de las condiciones experimentales o los factores genéticos presentes.

Resultados reportados con anterioridad por nuestro grupo de estudio señalan que la SNpc intacta de rata es permisiva a la supervivencia y desarrollo neuronal de CTE de ratón al ser trasplantadas en etapa de CE, lo cual es resultado de la interacción de las células con su microambiente (Maya-Espinosa et al., 2015). Además, cuando este mismo tipo celular es trasplantado en etapa de CE en la SNpc lesionada con 6-OHDA, se observa la expresión del marcador TH a los 7 dpt (Collazo-Navarrete et al., 2019). Sin embargo, sorprendentemente, el trasplante de CTPIh trasplantadas en etapa de CE no sobrevive en la SNpc lesionada y sin lesionar, a menos que expresen 3 factores de transcripción esenciales para la diferenciación DA mesencefálica (Ramos-Acevedo et al., 2023). Todos estos estudios se analizaron en un periodo máximo de 30 dpt, debido a una baja supervivencia a tiempos más largos.

Históricamente, la supervivencia a largo plazo de los trasplantes celulares ha representado un verdadero reto, lo que ha obstaculizado que esta estrategia pueda ser llevada de manera eficiente hacia la medicina traslacional. Es por ello que nuestros resultados son interesantes, debido a que el uso de trasplantes de CTPIh en etapa de PP podría incrementar la cantidad de neuronas DA que podrían diferenciarse terminalmente hacia el fenotipo TH<sup>+</sup> *in situ*. Adicionalmente, este trasplante constituye una herramienta que hasta ahora, nos ha permitido comprender más la capacidad de permitir la neurogénesis en el cerebro adulto.

Por otra parte, de manera interesante en nuestros ensayos no observamos la formación de tumores de las células implantadas, lo que sugiere que las células en etapa de PP tienen una ventaja adicional sobre el riesgo de implantar CTPIh en las que se ha observado la formación de teratomas (Fedele et al., 2017; Qiu et al., 2017). A su vez, también podrían ofrecer una ventaja sobre el trasplante de neuronas DA diferenciadas que escasamente logran sobrevivir a largo plazo (Boronat et al., 2017).

Actualmente, las moléculas responsables de facilitar la neurogénesis en la SNpc lesionada y sin lesionar, así como la magnitud y temporalidad de su expresión, permanecen sin identificar, mientras que en los sitios neurogénicos clásicos del cerebro adulto sólo se conocen parcialmente. Sin embargo, tal permisividad es un factor crucial a considerar al explorar el potencial de las terapias de trasplante de células para trastornos neurodegenerativos como la EP que actualmente se encuentran en curso en pacientes. La estrategia de trasplantar CTPIh en etapa de PP nos puede ayudar en un futuro a dilucidar los factores presentes en la SNpc que permiten el proceso de diferenciación DA.

### **Diferenciación de CTPIh trasplantadas en etapa de placa de piso hacia el fenotipo neuronal y TH<sup>+</sup>**

Observamos que las tres líneas celulares trasplantadas en etapa de PP además de sobrevivir, expresan marcadores específicos de un fenotipo neuronal inmaduro tales

como DCX y  $\beta$ -III tubulina. Al analizar la línea celular 3X *SNCA*, cualitativamente se encontró que la expresión de DCX<sup>+</sup>/ $\beta$ -III tubulina<sup>+</sup> estaba disminuida en las células trasplantadas tanto en la SNpc con SS, como en la SNpc lesionada con 6-OHDA. Estos hallazgos sugieren que las células con sobreexpresión de a-sin exhiben una diferenciación neuronal menos eficiente en comparación con la línea CTRL. De manera similar, la línea celular *SNCA* KO demostró una expresión más baja de DCX y  $\beta$ -III tubulina tanto en la SNpc no lesionada como lesionada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que es necesario realizar la cuantificación celular para determinar si existe una diferencia significativa en la expresión de estos marcadores entre las diferentes condiciones experimentales.

Por otra parte, en la EP, se ha observado la expresión de a-sin en la neuronas DAM. Sin embargo, actualmente, no existen muchos estudios de su expresión en las CTPih o en los precursores DA tempranos que la sobreexpresan, como son los de la etapa de PP. El análisis cualitativo de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y DA temprana en los trasplantes aquí realizado, sugiere que las células en etapa de PP que sobreexpresan o carecen de a-sin, exhiben niveles más bajos de diferenciación. Esto implica que la proteína a-sin juega un papel en la modulación de la eficiencia de la diferenciación neuronal en este contexto.

Varios reportes sugieren la relevancia de a-sin en el fenotipo dopaminérgico. Un estudio muestra que la presencia de a-sin endógena se asocia con un mayor número de neuronas DA en la SN durante el desarrollo, las cuales permanecen en la edad adulta comparado con una delección espontánea de a-sin en ratones (Garcia-Reitboeck et al., 2013). Sin embargo, como ya se ha mencionado, se ha mostrado una conexión entre la triplicación del gen *SNCA* y la expresión de una variante hereditaria de la EP, lo que sugiere que cantidades elevadas de a-sin inducen desencadenar la alteración. Por ejemplo, se ha reportado una relación significativa entre el aumento del estrés oxidativo con la sobreexpresión de a-sin (Benskey et al., 2016; Bernal-Conde et al., 2020). Asimismo, su sobreexpresión (a-sin) en mosca *Drosophila* conduce al incremento de la actividad de complejos remodeladores de

la cromatina (Sugeno et al., 2016). De manera que su incremento, podría llevar al silenciamiento genético de factores transcripcionales fundamentales en el proceso de diferenciación DA.

Por otro lado, en relación con la ausencia de la proteína  $\alpha$ -sin y su función *in vivo*, se han publicado diversos estudios para comprender las implicaciones de la ausencia de  $\alpha$ -sin, en la neurotransmisión de dopamina y la supervivencia neuronal. Un estudio describió que ratones *knockout* para el gen *SNCA* muestran una reducción de la dopamina estriatal y una disminución de la respuesta locomotora a la anfetamina, que depende de la dopamina (Abeliovich et al., 2000). Estos hallazgos sugieren que  $\alpha$ -sin es un regulador presináptico fundamental en la neurotransmisión de dopamina y su ausencia altera la dinámica de la dopamina (Abeliovich et al., 2000). La ausencia de  $\alpha$ -sin altera la dinámica de la dopamina, reduce la población de neuronas DA y modifica la respuesta a los estímulos relacionados con la dopamina (Garcia-Reitboeck et al., 2013). Sin embargo, mecanismos compensatorios pueden entrar en juego para proteger a las neuronas y mantener su supervivencia en ausencia de  $\alpha$ -sin, por lo que se requiere investigación adicional para dilucidar la participación de la  $\alpha$ -sin en el desarrollo *in vivo* de las neuronas DA.

En relación a la expresión de TH, se observó que tanto la línea CTRL como la *SNCA* KO exhibieron marca a TH<sup>+</sup> que colocalizaba con STEM121, lo que proporciona evidencia de que las células trasplantadas en etapa de PP se están diferenciando hacia neuronas DA. Es importante señalar que, la expresión de TH<sup>+</sup> parece menor en la línea *SNCA* KO, aunque para definirlo se requiere necesariamente realizar la cuantificación. Estos resultados sugieren que ambas líneas celulares son capaces de expresar TH cuando son implantadas en la SNpc tanto en el modelo de lesión de 6-OHDA como en el control de lesión de SS. En contraste, la línea celular con la 3X *SNCA* mostró baja expresión de TH en ambas condiciones experimentales. De manera que este hallazgo sugiere que la sobreexpresión de  $\alpha$ -sin puede interferir con la expresión eficiente de TH y la subsecuente diferenciación neuronal DA.

Aunque el marcaje de TH<sup>+</sup> fue más evidente en la línea celular CTRL trasplantada, la incapacidad para realizar la cuantificación celular representa una limitación de este estudio. Futuras investigaciones con métodos de cuantificación o técnicas alternativas para evaluar la expresión de TH serán útiles para validar y proporcionar una comprensión más precisa de las diferencias en la expresión de TH entre diferentes condiciones experimentales. Además, se requiere también analizar otros marcadores específicos de diferenciación DA que nos permitan asegurar que las células están alcanzando la diferenciación DAm terminal.

Finalmente, los resultados de este estudio brindan información sobre la presencia *in vivo* de la proteína a-sin en líneas celulares trasplantadas en la etapa PP. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la expresión de a-sin en la línea CTRL y la línea 3X SNCA en la etapa de PP a 2 mpt. Como esperábamos, la línea KO SNCA no expresa a-sin, y solo se observa la marca endógena de la SNpc. Una observación interesante es que la línea 3X SNCA trasplantada en el SNpc lesionada con 6-OHDA muestra un aumento aparente en el número de células que expresan a-sin. Este resultado sugiere una correlación potencial entre el daño celular inducido por 6-OHDA y la mayor expresión de a-sin en las células trasplantadas de la línea 3X SNCA.

Asimismo, estos resultados proporcionan evidencia valiosa de la expresión *in vivo* de a-sin en CTPih trasplantadas, la cual sugiere que la sobreexpresión de a-sin en las células en etapa de PP tiene implicaciones para su función e integración dentro del microambiente de la SNpc. Este es un hecho importante a considerar en las estrategias actuales dirigidas al trasplante autólogo de CTPih en pacientes. La pregunta que queda por responder sería ¿Las CTPih de un paciente con EP genético debido a la sobreexpresión de a-sin sería capaz de ser autotransplantado?

Por lo tanto, se requiere mayor investigación para explorar los mecanismos implicados en las variaciones observadas en la expresión de a-sin, y sus efectos potenciales sobre la diferenciación terminal de las células trasplantadas. Por lo cual, evaluar la expresión de a-sin con otros métodos como RT-PCR cuantitativa o Western blot desde la etapa de PP, sería un paso más hacia

comprender la dinámica de la expresión de a-sin en el contexto del trasplante y la función de esta proteína en etapas tempranas de diferenciación, así como en la 3X SNCA.

No obstante, estos resultados contribuyen a ampliar nuestro conocimiento del impacto de la a-sin en la diferenciación neuronal de CTPih en la SNpc, destacando su papel potencial en la regulación de procesos celulares de diferenciación asociados con el neurodesarrollo y las enfermedades neurodegenerativas. Estos hallazgos tienen implicaciones para futuras investigaciones destinadas a dilucidar los mecanismos subyacentes a la diferenciación neuronal y las estrategias terapéuticas dirigidas a la regulación de la expresión de a-sin en trastornos neurodegenerativos como la EP y otras alfa-sinucleinopatías.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares CTRL, 3X *SNCA* y *SNCA* KO son capaces de sobrevivir a 2 mpt cuando son trasplantadas en etapa de PP en la SNpc lesionada con 6-OHDA o en un control de lesión SS, por lo que se sugiere que la SNpc es un nicho permisivo para la sobrevivencia celular en dichas condiciones.
2. Las líneas células trasplantadas en la etapa de PP de la línea CTRL y *SNCA* KO son capaces de expresar TH en la SNpc tanto en el modelo de lesión con 6-OHDA como en el control de lesión con SS, en contraste con la línea con 3X *SNCA*, donde observamos una baja expresión de TH en ambas condiciones experimentales a 2 mpt.
3. Por su parte, la ausencia de *a-sin* mediada por el *KO* isogénico, no tiene efectos negativos sobre la sobrevivencia a 2 mpt en las células trasplantadas en etapa placa de piso.

## BIBLIOGRAFÍA

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.-H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M. G., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., & Rosenthal, A. (2000). Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron*, 25(1), 239–252. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80886-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80886-7)

Alison, M. R., Poulosom, R., Forbes, S., & Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells. *The Journal of Pathology*, 197(4), 419-423. doi:10.1002/path.1187

Arenas, E., Denham, M. and Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development (Cambridge)*, 142(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>

Barker, R. A. and Kuan, W. L. (2010). Graft-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease: What Is It All About? *Cell Stem Cell*, 7(2), 148–149. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.07.003>

Barker, R. A., Drouin-Ouellet, J. and Parmar, M. (2015). Cell-based therapies for Parkinson disease-past insights and future potential. *Nature Reviews Neurology*, 11(9), 492–503. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.123>

Barker, R. A., Parmar, M., Studer, L. and Takahashi, J. (2017). Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell*, 21(5), 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014>

Bendor, J. T., Logan, T. P. and Edwards, R. H. (2013). The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*, 79(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>

Benskey, M. J., Perez, R. G. and Manfredsson, F. P. (2016). The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 137(3), 331–359. <https://doi.org/10.1111/jnc.13570>

Bernal-Conde, L. D. (2020). Maestría en Ciencias Bioquímicas [Universidad Nacional Autónoma de México]. Estudio de la diferenciación dopaminérgica de células troncales pluripotentes inducidas con triplicación del gen de alfa-sinucleína en un modelo de la enfermedad de Parkinson. <http://132.248.9.195/ptd2020/noviembre/0805684/index.html>

Bernal-Conde, L. D., Ramos-Acevedo, R., Reyes-Hernández, M. A., Balbuena-Olvera, A. J., Morales-Moreno, I. D., Argüero-Sánchez, R., Schüle, B. and Guerra-Crespo, M. (2020). Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles. *Frontiers in Neuroscience*, 13(January), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01399>



- Betarbet, R., Sherer, T. B., & Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays*, 24(4), 308–318. <https://doi.org/10.1002/bies.10067>
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/845618>
- Boronat-García, A., Guerra-Crespo, M., & Drucker-Colín, R. (2017). Historical perspective of cell transplantation in Parkinson's disease. *World Journal of Transplantation*, 7(3), 179–192. <https://doi.org/10.5500/wjt.v7.i3.179>
- Boronat-García, A., Palomero-Rivero, M., Guerra-Crespo, M., Millán-Aldaco, D. and Drucker-Colín, R. (2016). Intrastratial grafting of chromospheres: Survival and functional effects in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 11(8), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160854>
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211(Supplement C), 51-76. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Braak, H., Del, K., Rüb, U., Vos, R. A. I. De, Jansen, E. N. H. and Braak, E. (2003). \*Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson ' s disease\*. \*24\*, 197–211.
- Byers, B., Cord, B., Nguyen, H. N., Schüle, B., Fenno, L., Lee, P. C., Deisseroth, K., Langston, J. W., Pera, R. R. and Palmer, T. D. (2011). SNCA triplication parkinson's patient's iPSC-Derived DA neurons accumulate  $\alpha$ -Synuclein and are susceptible to oxidative stress. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026159>
- Byrne, J. A., Nguyen, H. N. and Reijo Pera, R. A. (2009). Enhanced generation of induced pluripotent stem cells from a subpopulation of human fibroblasts. *PLoS ONE*, 4(9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007118>
- Cacabelos, R. (2017). Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M. and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, 27(3), 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>
- Chambers, S. M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X. J., Niu, L., Bilsland, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P., Shi, S. H. and Studer, L. (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nature Biotechnology*, 30(7), 715–720. <https://doi.org/10.1038/nbt.2249>

Charcot J-M. (1877). On Parkinson's disease. In Lectures on diseases of the nervous system delivered at the Salpêtrière (transl. Sigerson G), pp. 129–156. New Sydenham Society, London.

Chesselet, M. F. (2008). In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: A useful model of Parkinson disease? *Experimental Neurology*, 209(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.08.006>

Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., Lowry, W. E. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.008>

Chung, S., Leung, A., Han, B. S., Chang, M. Y., Moon, J. II, Kim, C. H., Hong, S., Pruzsak, J., Isacson, O. and Kim, K. S. (2009). Wnt1-lmx1a Forms a Novel Autoregulatory Loop and Controls Midbrain Dopaminergic Differentiation Synergistically with the SHH-FoxA2 Pathway. *Cell Stem Cell*, 5(6), 646–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.015>

CiRA annual report 2022. (n.d.). [Www.cira.kyoto-u.ac.jp](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp). Retrieved October 31, 2023, from [https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/annual\\_report/ar\\_2022/e/#/itakahashi](https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/annual_report/ar_2022/e/#/itakahashi)

Collazo-Navarrete, O., Hernández-García, D., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colín, R., Guerra-Crespo, M. and Covarrubias, L. (2019). The Substantia Nigra Is Permissive and Gains Inductive Signals When Lesioned for Dopaminergic Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 28(16), 1104–1115. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0226>

Dauer, W., Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 11;39(6):889-909. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00568-3

Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Experimental Neurology*, 175(2), 303–317. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7891>

Devine, M. J., Rytén, M., Vodicka, P., Thomson, A. J., Burdon, T., Houlden, H., Cavaleri, F., Nagano, M., Drummond, N. J., Taanman, J. W., Schapira, A. H., Gwinn, K., Hardy, J., Lewis, P. A. and Kunath, T. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the  $\alpha$ -synuclein locus. *Nature Communications*, 2(1), 410–440. <https://doi.org/10.1038/ncomms1453>

Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M. and Takahashi, J. (2014). Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful

transplantation. *Stem Cell Reports*, 2(3), 337–350.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.013>

Fasano, C. A., Chambers, S. M., Lee, G., Tomishima, M. J. and Studer, L. (2010). Efficient Derivation of Functional Floor Plate Tissue from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 6(4), 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.001>

Faull, R. L. M., & Laverly, R. (1969). Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Experimental Neurology*, 23(3), 332–340. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(69\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(69)90081-8)

Fedele, S., Collo, G., Behr, K., Bischofberger, J., Müller, S., Kunath, T., Christensen, K., Gündner, A. L., Graf, M., Jagasia, R. and Taylor, V. (2017). Expansion of human midbrain floor plate progenitors from induced pluripotent stem cells increases dopaminergic neuron differentiation potential. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05633-1>

Flierl, A., Oliveira, L. M. A., Falomir-Lockhart, L. J., Mak, S. K., Hesley, J., Soldner, F., Arndt-Jovin, D. J., Jaenisch, R., Langston, J. W., Jovin, T. M. and Le, B. S. (2014). Higher vulnerability and stress sensitivity of neuronal precursor cells carrying an alpha-synuclein gene triplication. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112413>

Freed, C. R., Zhou, W. and Breeze, R. E. (2011). Dopamine Cell Transplantation for Parkinson's Disease: The Importance of Controlled Clinical Trials. *Neurotherapeutics*, 8(4), 549–561. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0082-9>

Galvin J. E., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q. (2001). Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *\*Arch. Neurol.\** 58 186–190.

Ganat, Y. M., Calder, E. L., Kriks, S., Nelander, J., Tu, E. Y., Jia, F., Battista, D., Harrison, N., Parmar, M., Tomishima, M. J., Rutishauser, U. and Studer, L. (2012). Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2928–2939. <https://doi.org/10.1172/JCI58767>

Garcia-Reitboeck, P., Anichtchik, O., Dalley, J. W., Ninkina, N., Tofaris, G. K., Buchman, V. L. and Spillantini, M. G. (2013). Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Experimental Neurology*, 248, 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.015>

Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>

Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Björklund, A. and Parmar, M. (2014). Human

ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 15(5), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>

Guide, U. (2016). PSC Dopaminergic Neuron Differentiation Kit USER GUIDE.

Hagell, P., Piccini, P., Björklund, A., Brundin, P., Rehnström, S., Widner, H., Crabb, L., Pavese, N., Oertel, W. H., Quinn, N., Brooks, D. J. and Lindvall, O. (2002). Dyskinesias following neural transplantation in parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 5(7), 627–628. <https://doi.org/10.1038/nn863>

Hallett, P. J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G. A., Cooper, O., Osborn, T. M., Sundberg, M., Moore, M. A., Perez-Torres, E., Brownell, A. L., Schumacher, J. M., Spealman, R. D. and Isacson, O. (2015). Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 16(3), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.018>

Hipp, J. and Atala, A. (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s12015-008-9010-8>

Hisahara, S., & Shimohama, S. (2011). Toxin-Induced and Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, 2011, 1–14. <https://doi.org/10.4061/2011/951709>

Jankovic, J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 79(4): p. 368-376.

Kang EJ, Lee YH, Kim MJ, Lee YM, Kumar BM, Jeon BG, Ock SA, Kim HJ, Rho GJ. Transplantation of porcine umbilical cord matrix mesenchymal stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Mar;7(3):169-82. doi: 10.1002/term.504.

Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development*, 19(10), 1129–1155. <https://doi.org/10.1101/GAD.1303605>

Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M. and Takahashi, J. (2017). Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*, 548(7669), 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature23664>

Kim, T. W., Koo, S. Y. and Studer, L. (2020). Pluripotent Stem Cell Therapies for Parkinson Disease: Present Challenges and Future Opportunities. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(August). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00729>

Kirkeby, A., Nolbrant, S., Tiklova, K., Heuer, A., Kee, N., Cardoso, T., Ottosson, D. R., Lelos, M. J., Rifés, P., Dunnett, S. B., Grealish, S., Perlmann, T. and Parmar, M. (2017). Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*, 20(1), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.09.004>

Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V. and Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>

Landry, D. W. and Zucker, H. A. (2004). Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 114(9), 1184–1186. <https://doi.org/10.1172/JCI23065>

Langston J. W., Schule B., Rees L., Nichols R. J., Barlow C. (2015). Multisystem Lewy body disease and the other Parkinsonian disorders. *\*Nat. Genet.\** 47 1378–1384. 10.1038/ng.3454

Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A. and Masliah, E. (2013). The many faces of  $\alpha$ -synuclein: From structure and toxicity to therapeutic target. *\*Nature Reviews Neuroscience\**, 14(1), 38–48. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>

Lee, A. and Gilbert, R. M. (2016). Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics*, 34(4), 955–965. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>

Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D. and Björklund, A. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247(4942), 574–577. <https://doi.org/10.1126/science.2105529>

Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Åstedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Björklund, A., Leenders, K. L., Rothwell, J. C., Frackowiak, R., Marsden, C. D., Johnels, B., Steg, G., Freedman, R., Hoffer, B. J., Seiger, Å., Bygdeman, M., Strömberg, I. and Olson, L. (1989). Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson's Disease: A Detailed Account of Methodology and a 6-Month Follow-up. *Archives of Neurology*, 46(6), 615–631. <https://doi.org/10.1001/archneur.1989.00520420033021>

Llibre-Guerra, J. J., Prina, M., Sosa, A. L., Acosta, D., Jimenez-Velazquez, I. Z., Guerra, M., Salas, A., Llibre-Guerra, J. C., Valvuerdi, A., Peeters, G., Ziegemeier, E., Acosta, I., Tanner, C., Juncos, J. and Llibre Rodriguez, J. J. (2022). Prevalence of parkinsonism and Parkinson disease in urban and rural populations from Latin America: A community based study. *The Lancet Regional Health - Americas*, 7, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100136>

Ma, Y., Feigin, A., Dhawan, V., Fukuda, M., Shi, Q., Greene, P., Breeze, R., Fahn, S., Freed, C. and Eidelberg, D. (2002). Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: A PET study. *Annals of Neurology*, 52(5), 628–634. <https://doi.org/10.1002/ana.10359>

Manzanza, N. de O., Sedlackova, L. and Kalaria, R. N. (2021). Alpha-Synuclein Post-translational Modifications: Implications for Pathogenesis of Lewy Body Disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(June), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.690293>

Martí, M. J., Tolosa, E., and Campdelacreu, J. (2003). Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov. Disord.* 18, 21–27. doi: 10.1002/mds.10559

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>

Maya-Espinosa, G., Collazo-Navarrete, O., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Guerrero-Flores, G., Drucker-Colín, R., Covarrubias, L. and Guerra-Crespo, M. (2015). Mouse embryonic stem cell-derived cells reveal niches that support neuronal differentiation in the adult rat brain. *Stem Cells*, 33(2), 491–502. <https://doi.org/10.1002/stem.1856>

Morrison, S. J., Shah, N. M. and Anderson, D. J. (1997). Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell*, 88(3), 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81867-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81867-X)

Morrison, S. J., Shah, N. M. and Anderson, D. J. (2010). Stem cell biology. *In-Vitro Fertilization*, Third Edition, 88, 93–108. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511984761.008>

Oertel, W., & Schulz, J. B. (2016). Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *Journal of Neurochemistry*, 139, 325–337. <https://doi.org/10.1111/jnc.13750>

Oh, Y. (2019). Patient-specific pluripotent stem cell-based Parkinson's disease models showing endogenous alpha-synuclein aggregation. *BMB Reports*, 52(6), 349–359. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.6.142>

Oliveira, L. M. A., Falomir-Lockhart, L. J., Botelho, M. G., Lin, K. H., Wales, P., Koch, J. C., Gerhardt, E., Taschenberger, H., Outeiro, T. F., Lingor, P., Schüle, B., Arndt-Jovin, D. J. and Jovin, T. M. (2015). Elevated  $\alpha$ -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell Death and Disease*, 6(11), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.318>

Parkinson J. (1817). An essay on the shaking palsy. London: Sherwood, Neely and Jones; Reprinted in: Neuropsychiatric classics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;14:223–236.

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223–236. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>

Parmar, M., Grealish, S. and Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(2), 103–115. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>

Paxinos, G. and Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates.

Peelaerts W., Baekelandt V. (2016),  $\alpha$ -Synuclein strains and the variable pathologies of synucleinopathies. *J. Neurochem.* 139 256–274. 10.1111/jnc.13595

Perese, D. A., Ulman, J., Viola, J., Ewing, S. E., & Bankiewicz, K. S. (1989). A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Research*, 494(2), 285–293. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90597-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90597-0)

Piccini, P., Lindvall, O., Björklund, A., Brundin, P., Hagell, P., Ceravolo, R., Oertel, W., Quinn, N., Samuel, M., Rehnström, S., Widner, H. and Brooks, D. J. (2000). Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Annals of Neurology*, 48(5), 689–695. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200011\)48:5<689::AID-ANA1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200011)48:5<689::AID-ANA1>3.0.CO;2-N)

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E. and Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. and Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>

Proukakis, C., Houlden, H. and Schapira, A.H. (2013), Somatic alpha-synuclein mutations in Parkinson's disease: Hypothesis and preliminary data. *Mov Disord.*, 28: 705-712. <https://doi.org/10.1002/mds.25502>

Przedbroski, S., Leviver, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., & Togasaki, D. M. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, 67(3), 631–647. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00066-r](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00066-r)

Qiu, L., Liao, M. C., Chen, A. K., Wei, S., Xie, S., Reuveny, S., Zhou, Z. D., Hunziker, W., Tan, E. K., Oh, S. K. W. and Zeng, L. (2017). Immature Midbrain Dopaminergic Neurons Derived from Floor-Plate Method Improve Cell Transplantation Therapy Efficacy for Parkinson's Disease. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(9), 1803–1814. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0470>

Ramos, R. (2018). Análisis De Marcadores Dopaminérgicos En Células Troncales Embrionarias Humanas Que Sobre Expresan Lmx1a, Otx2 Yfoxa2 En Un Modelo De Parkinson (pp. 1–58) [Tesis de Licenciatura]. <http://132.248.9.195/ptd2018/mayo/0774274/Index.html>

Ramos-Acevedo, R., Morato-Torres, C. A., Padilla-Godínez, F. J., Bernal-Conde, L. D., Palomero-Rivero, M., Zafar, F., Collazo-Navarrete, O., Soto-Rojas, L. O., Schüle, B., & Guerra-Crespo, M. (2023). Embryoid Body Cells from Human Embryonic Stem Cells Overexpressing Dopaminergic Transcription Factors Survive and Initiate Neurogenesis via Neural Rosettes in the Substantia Nigra. *Brain Sciences*, 13(2), 329. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020329>

Rodríguez, M., Villar, A., Valencia, C. and Cervantes, A. (2011). Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Archivos de Neurociencias*, 16(2), 64–68 DOI: 10.24875/GMM.18003702

Ross, S. and Hill, C. S. (2008). How the Smads regulate transcription. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(3), 383–408. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.09.006>

Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F. and Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature Medicine*, 12(11), 1259–1268. <https://doi.org/10.1038/nm1495>

Saiki, S., Sato, S., & Hattori, N. (2012). Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(4), 430–436. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301205>

Schuele, B., Zafar, F., Shin, S., Michael, D., Nguyen, A., Flierl, A., Schuele, B., Zafar, F., Shin, S., Michael, D., Nguyen, A. and Flierl, A. (2016). High-efficiency differentiation into functional dopaminergic neurons from Parkinson's patients-derived induced pluripotent stem cells. *F1000Research*, 5. <https://doi.org/10.7490/F1000RESEARCH.1112457.1>

Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T.-Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I.-H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., ... Kim, K.-S. (2020). Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 382(20), 1926–1932. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1915872>



- Sekigawa A., Takamatsu Y., Sekiyama K., Hashimoto M. (2015). Role of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Synucleins in the axonal pathology of Parkinson's disease and related synucleinopathies. *Biomolecules* 5 1000–1011. [10.3390/biom5021000](https://doi.org/10.3390/biom5021000)
- Simon, D. K., Tanner, C. M. and Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Singh, N., Pillay, V. and Choonara, Y. E. (2007b). Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2006.11.009>
- Singh, N., Pillay, V., & Choonara, Y. E. (2007a). Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.009>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R. and Goedert, M. (1997).  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997 388:6645, 388(6645), 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Steinbeck, J. A. and Studer, L. (2015). Moving stem cells to the clinic: Potential and limitations for brain repair. *Neuron*, 86(1), 187–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.002>
- Sugeno, N., Jäckel, S., Voigt, A., Wassouf, Z., Schulze-Hentrich, J., & Kahle, P. J. (2016).  $\alpha$ -Synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation and H3K9me2-dependent transcriptional responses. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36328>
- Sung, V. W., Nicholas, A. P. (2013). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. *Neurol Clin.* 2013 Aug;31(3 Suppl):S1-16. doi: 10.1016/j.ncl.2013.04.013
- Swistowski, A., Peng, J., Han, Y., Swistowska, A. M., Rao, M. S. and Zeng, X. (2009). Xeno-free defined conditions for culture of human embryonic stem cells, neural stem cells and dopaminergic neurons derived from them. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006233>
- Sylvester, K. G., & Longaker, M. T. (2004). Stem Cells. *Archives of Surgery*, 139(1), 93. <https://doi.org/10.1001/archsurg.139.1.93>
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A. and Tanaka, M. (2016). Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *Journal of Comparative Neurology*, 524(6), 1236–1258. <https://doi.org/10.1002/cne.23901>
- Takahashi, J. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: The Kyoto trial. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 230). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.11.004>

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

Tarasova, T. V., Lytkina, O. A., Goloborshcheva, V. V., Skuratovskaya, L. N., Antohin, A. I., Ovchinnikov, R. K. and Kukharsky, M. S. (2018). Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain. *PeerJ*, 2018(MAY). <https://doi.org/10.7717/peerj.4779>

Trétiakoff C. (1921). Contribution a L'étude de L'anatomie du locus niger. *Rev Neurol* 37: 592–608.

Vazin, T., Chen, J., Lee, C.-T., Amable, R. and Freed, W. J. (2008). Assessment of Stromal-Derived Inducing Activity in the Generation of Dopaminergic Neurons from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26(6), 1517–1525. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2008-0039>

Volakakis, N., Tiklova, K., Decressac, M., Papathanou, M., Mattsson, B., Gillberg, L., Nobre, A., Björklund, A. and Perlmann, T. (2015). Nurr1 and retinoid X receptor ligands stimulate ret signaling in dopamine neurons and can alleviate  $\alpha$ -synuclein disrupted gene expression. *Journal of Neuroscience*, 35(42), 14370–14385. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1155-15.2015>

Wales, P., Lázaro, D. F., Pinho, R. and Outeiro, T. F. (2013). Limelight on alpha-synuclein: Pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 415–459. <https://doi.org/10.3233/JPD-130216>

Weiss, M. L., Medicetty, S., Bledsoe, A. R., Rachakatla, R. S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M. S., Velagaleti, G. and Troyer, D. (2006). Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *\*Stem Cells\**, 24(3), 781–792. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0330>

Widner, H., Tetrud, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Björklund, A., Lindvall, O. and Langston, J. W. (1992). Bilateral Fetal Mesencephalic Grafting in Two Patients with Parkinsonism Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-L,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP). *New England Journal of Medicine*, 327(22), 1556–1563. <https://doi.org/10.1056/nejm199211263272203>

Wu, J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2016). Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell*, 165(7), 1572–1585. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.043>

Yang, N., Zhang, L. and Shen, L. (1999). The synuclein family. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 26(6), 524.

Zafar, F., Flierl, A., Srivastava, R. and Schüle, B. (2015). CRISPR knock-out of alpha-synuclein in patient-derived pluripotent stem cell model of Parkinson's disease. *C*, 35. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.318.Figure>

Zhang, J. and Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/727542>