



U N A M

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNAM CAMPUS JURIQUILLA, QRO

*Estudio de la Respuesta Quimiotrópica de Neuronas
positivas a Hidroxilasa de Tirosina Generadas In Vitro a
Partir de Células Troncales Embrionarias*

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

Psicóloga Claudia Marcela García Peña Acosta

Director de Tesis

Dra. Elisa Tamariz Domínguez Dr. Alfredo Varela Echavarría



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

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la tranquilidad y paciencia para alcanzar mis metas

A mis padres, Marcela Acosta Hernández por su amor incondicional, consejos y apoyo en todas las decisiones por buenas o malas que he tomado en mi vida; Héctor Guillermo García Peña Gutiérrez por haberme brindado su amor y tolerancia con los diferentes tropiezos en mi vida. A ambos por darme la vida y criarme como un ser humano respetable y con principios.

A mi hermano Héctor Ricardo por enseñarme que despertar en el mundo implica manejar mi destino.

A todos mis tíos, Rodolfo Acosta, Raúl Acosta y Ángela Acosta; mis padrinos Lilia Acosta y Sergio Villanueva por siempre estar pendiente de mi salud y bienestar.

A mi abuela Guillermina por quererme y siempre estar orgullosa de mi.

A mi Dra. Elisa Tamariz Domínguez, no solo por ser mi tutora y guía en estos 2 años de Maestría, sino por ser tolerante y paciente con su alumna. Por ser una mujer intachable y con los principios científicos necesarios para formarme con los lineamientos para poder aspirar a ser un investigadora.

Al Dr. Alfredo Varela-Echavarría por haber sido mi tutor y siempre estar ahí para apoyarme y aconsejarme siempre hacia lo correcto. Por mostrarme que el trabajo científico es conocimiento y formación de carácter. Por aceptarme en su laboratorio si saber quien era yo.

Al Dr. Ivan Velasco Velásquez por ser un tutor excelente, darme los consejos necesarios para iniciar y concretar mi preparación en la maestría, así como darme el apoyo necesario para realizar los experimentos en su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular.

A la Dra. Sofía Díaz por ser mi sinodal durante 2 años y aportar siempre los lineamientos precisos para la escritura de esta tesis.

A la Dra. Magda Giordano por haber sido mi maestra y revisora de esta tesis, siempre dando excelentes observaciones para pulir mis conocimientos y hacer una tesis de calidad.

Al Dr. Jesús Chimal ya al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por ser revisores de mi tesis y dedicarle tiempo la lectura y corrección de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado beca durante mis 2 años en la Maestría en ciencia (neurobiología) Becario No: 200239

A las unidades de Análisis de Imágenes Digitales a Nydia Hernández Ríos, a la unidad de Biología Molecular a la Dra. Anaid Antaramian Salas, al Bioterio al M.V.Z. Martín García Servín, Técnico Académico Carmen Mejía, Biblioteca a la Bib. Pilar Galarza Barrios y Bib. Rafael Silva Cruz, Cómputo al Ing. Alberto Lara Ruvalcaba e Ing. Omar González Hernández, en la coordinación de posgrado a M en C. Leonor Casanova Rico y Videoconferencia a la Psic. Lourdes Lara Ayala. Así mismo agradecer a las secretarías de posgrado del Instituto de neurobiología que tanto me ayudaron en mis trámites.

INDICE

Estudio de la Respuesta Quimiotrópica de Neuronas positivas a Hidroxilasa de Tirosina Generadas In Vitro a Partir de Células Troncales Embrionarias

Resumen	1
Abstract	2
Agradecimientos	3
Abreviaturas	4
1. Introducción	5
2. Antecedentes generales	7
2.1 Descripción anatómica y funcional de los sistemas dopaminérgicos	7
2.1.1 Distribución de las neuronas dopaminérgicas	7
2.1.2 Diferenciación de las neuronas dopaminérgicas y la formación de la vía negro-estrial	8
2.2 Función de las moléculas quimiotrópicas durante el desarrollo embrionario	10
2.2.1 Netrinas	12
2.2.2 Efrinas	12
2.2.3 Semaforinas	12
2.2.4 Slits	13
2.3 Moléculas quimiotrópicas involucradas en el establecimiento de la vía negro-estrial durante el desarrollo embrionario	13
2.3.1 Importancia de la molécula slit en la formación de la vía negro-estrial	14
2.4 Degeneración de neuronas dopaminérgicas: enfermedad de parkinson	17
2.4.1 Etiología de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta	18
2.5. La sustitución celular como alternativa de tratamiento para la ausencia de neuronas dopaminérgicas de la vía negro-estrial	20

2.5.1. Las células troncales embrionarias como una alternativa de sustitución de neuronas dopaminérgicas.	22
2.5.2 Problemáticas centrales en las terapias de sustitución de neuronas dopaminérgicas	26
3. Planteamiento del problema	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos particulares	30
6. Material y métodos	31
6.1 Proceso de diferenciación de células troncales embrionarias a neuronas TH ⁺	31
6.2 Obtención de cultivos de células troncales embrionarias diferenciados a TH ⁺ para inmunotinción contra Robo 1, Robo 2 y Robo N	32
6.3 Cultivo de explantes del área ventral del mesencéfalo embrionario	32
6.4 Inmunotinciones	33
6.5 Amplificación de vectores slit 1 y proteína verde fluorescente	34
6.6 Digestiones con enzimas de restricción	34
6.7 Transfección de células HEK293 e inclusión en geles de colágena	34
6.8 Cuantificación, mediciones y análisis estadístico	35
6.8.1 cuantificación de células TH ⁺ mesencefálicas y células TH ⁺ obtenidas <i>in vitro</i> de CTE	35
6.8.2 Cuantificación de ángulos en células TH ⁺ obtenidas <i>in vitro</i>	36
6.8.3 Medición de longitud de axones	37
7. Resultados	38
7.1 Estandarización del proceso de diferenciación de células troncales a TH ⁺ por el protocolo de 5 pasos	38
7.2 Bajo porcentaje de expresión de receptores a Slit en células TH ⁺ obtenidas <i>in vitro</i> a partir de CTE y células TH ⁺ de explantes de mesencéfalo embrionario	41
7.3 Los axones Robo ⁺ y TH ⁻ del área ventral del mesencéfalo expresan una respuesta de inhibición de crecimiento ante Slit 1	45

7.4 Las neuronas TH ⁺ /Robo ⁺ obtenidas <i>in vitro</i> a partir de CTE no responden a Slit 1, solo neuronas Robo ⁺ responden con inhibición del crecimiento axonal	49
8. Discusión	54
8.1 Expresión diferencial de Robo durante la formación de la vía negro-estrial sus implicaciones estructurales y funcionales	54
8.2 Posible interacción entre axones TH ⁻ /Robo ⁺ y axones TH ⁺ /Robo ⁻	55
8.3 CTE diferenciadas <i>in vitro</i> a células TH ⁺ presentan expresión de receptores Robo 1 y 2, pero no responden a Slit 1	58
9. Conclusiones	59
10. Referencias	60
11. Anexos	71
11.1 Proceso de diferenciación	71
11.2 Medios de cultivo	73
11.3 Preparación de co-cultivo en geles de colágena	74
11.4 Digestión de vector mSlit1CS2 con enzimas de restricción	76

RESUMEN

Las neuronas dopaminérgicas (NDA), identificadas por la expresión de la enzima hidroxilasa de tirosina (TH), de la Sustancia Negra pars compacta son esenciales en el control del movimiento. La degeneración de estas células en los humanos produce la enfermedad de Parkinson (EP) por la pérdida de la Vía Negro-Estrial (VNE). Estudios recientes han involucrado a moléculas quimiotrópicas como las Efrinas, Netrinas, Slit y Semaforinas en la formación de la VNE. En este trabajo se caracterizó la respuesta de los axones de NDA derivadas in vitro de células troncales embrionarias (CTE-TH⁺) por su posible uso en protocolos de sustitución celular en modelos de EP. Se comparó la respuesta de las CTE- TH⁺ con NDA del mesencéfalo embrionario (VM).

Se observó que entre el 10.45% y el 29.66% de las células TH⁺ presentes en explantes VM de rata del estadio (E) 12 a el E15 expresan Robo 1 y 2, incrementándose Robo 2 al 98.5% en E15. En cultivos de explantes de VM de E14, los axones Robo⁺ y, sorprendentemente, los axones TH⁺/Robo⁻ fueron inhibidos por Slit 1, posiblemente por una fasciculación con axones Robo⁺. El aumento drástico de la proporción de células dopaminérgicas que expresan el receptor a Robo 2 en E15 podría implicar un freno del crecimiento de los axones dopaminérgicos de tal manera que las NDA no rebasen los límites donde se expresa Slit 1.

Las CTE-TH⁺ expresan Robo 1 y Robo 2 en proporciones similares a los explantes de VM de E12-E14, sin embargo, no se observó una respuesta inhibitoria o repelente de Slit 1 en los axones TH⁺/Robo⁺ pero si se observó respuesta de inhibición del crecimiento en axones de neuronas Robo 1⁺ y Robo 2⁺. Esta ausencia de respuesta inhibitoria ante Slit 1 puede ser por la carencia de elementos que sí están presentes en explantes de VM.

ABSTRACT

The dopaminergic neurons from the Substantia Nigra pars compacta are essential in movement control by regulating the striatum to which dopaminergic axons project via the nigro-striatal pathway (NSP). The loss of dopaminergic neurons in humans is characteristic of Parkinson's disease. Axon guidance molecules of the Ephrin, Netrin, Semaphorins Slit families have been implicated in the NSP formation. In this work, we studied the response to Slit1 from dopaminergic neurons (DAN) derived from embryonic stem (ES) cells: these cells have been proposed for cell replacement therapy for Parkinson's disease. We made a comparison of the response of DAN from embryonic rat ventral mesencephalon (VM). We show that between 10.45% and 29.66% of the tyrosine hydroxylase-positive (TH^+) cells present in cultured VM explants from E12 to E14, express Robo 1 and 2, and that the expression of the latter increases dramatically to 98.5% in E15. When we exposed E14 VM explants to Slit 1, we found inhibition of Robo⁺ axon outgrowth, including TH^+ axons and $TH^+/Robo^-$ axons as well. The latter, however, were found to grow fasciculate with $TH/Robo^+$ axons. The proportion of cells expressing Robo 2 in E15 could be related to an eventual stop of dopaminergic axon's growth upon reaching the striatum as a consequence of the presence of Slit 1 in this region.

On the other hand, TH^+ neurons differentiated in vitro from embryoid bodies generated from ES cells, expressed Robo 1 and Robo 2 in proportions similar to those of VM explants from E12 to E14. When we exposed ES-derived TH^+ cells to Slit1 we detected neither outgrowth inhibition nor repulsive effects, possibly due to the absence of elements present in VM explants such as non-dopaminergic neurons. Furthermore, we observed that axon growth Robo 1⁺ and Robo 2⁺ neurons were inhibited by Slit 1. The absence of inhibitory response from ES-derived TH^+ neurons to Slit 1 is probably for the absence of elements present in VM explants.

1. INTRODUCCIÓN

Las neuronas dopaminérgicas (NDA) del área ventral del mesencéfalo que conforman el núcleo de la Sustancia Negra pars compacta (SNpc) son esenciales en el control del movimiento. Cuando estas neuronas degeneran por diversas etiologías en los humanos, se produce la enfermedad de Parkinson (EP), en la que hay una disminución de dopamina en el estriado que es el blanco de los axones dopaminérgicos (Cardoso et al., 2005). Dada su relevancia clínica, se han intentado caracterizar las propiedades de estas neuronas así como generarlas *in vitro* e *in vivo* por diferentes metodologías, con la finalidad de realizar tratamientos de sustitución celular para la EP.

Se sabe que durante el desarrollo embrionario de ratas, los axones dopaminérgicos del área ventral del mesencéfalo inician su proyección en E12, navegando a través del diencéfalo hasta llegar al telencéfalo, donde detienen su crecimiento en E15 y establecen sus conexiones con el estriado formando la vía negro-estriada (VNE) (Gates et al., 2004). Diversas moléculas quimiotrópicas se han involucrado en el establecimiento de la VNE al controlar la dirección del crecimiento de los axones dopaminérgicos. Algunas de estas moléculas son las Netrinas, las Efrinas, las Semaforinas y las proteínas Slit. El entender el papel de estas moléculas en la formación de la VNE aportaría información para mejorar tratamientos experimentales para la EP, los cuales consisten en la implantación de células dopaminérgicas en los cerebros lesionados. A los trasplantes de células para compensar la carencia o ausencia de una función celular se le denomina terapia de sustitución celular.

La exploración de métodos terapéuticos para la enfermedad de Parkinson por sustitución celular ha consistido principalmente en implantar en el estriado células que producen dopamina. En humanos se han utilizado células fetales mesencefálicas (Druker-Colin y Verdugo-Díaz, 2003) así como células cromafines, las cuales son provenientes del linaje simpático-adrenal (Fernandez-Espejo et al., 2005). Recientemente se han utilizado neuronas dopaminérgicas diferenciadas *in vitro* a partir de células troncales embrionarias (CTE) en modelos animales de la EP como ratas y en primates no humanos, encontrando mejoría en los signos de la EP (Kim et al., 2002, Takagi et al., 2005). La utilización de CTE tiene la ventaja de que, al ser células que proliferan rápidamente, se puede obtener una gran cantidad de neuronas positivas a hidroxilasa de tirosina (TH⁺), que es la enzima que participa al inicio de la cadena de síntesis de la dopamina. Además se ha demostrado que las células TH⁺ generadas *in vitro* a partir de células troncales embrionarias

(CTE-TH⁺) expresan algunos de los marcadores para las NDA, que responden electrofisiológicamente de manera similar a las NDA adultas cuando han sido implantadas y que el 30% de las neuronas TH⁺ transplantadas sobreviven después 8 semanas (Kim et al., 2002). Por otro lado se ha observado una mejoría de los signos de EP en modelos animales de ratas y primates transplantados con CTE-TH⁺ (Kim et al., 2002; Takagi et al., 2005). Sin embargo, existen aún problemas importantes con los que se enfrentan estos procedimientos como la baja sobrevivencia de las células implantadas, dificultades en la obtención de suficientes células con un fenotipo particular por métodos de diferenciación, así como la ausencia o ineficiencia de invasión de los blancos de los axones de las células transplantadas.

Dado el potencial del uso de las CTE en el tratamiento de pacientes con EP, es importante establecer y analizar a profundidad las características dopaminérgicas de las neuronas obtenidas *in vitro*. Al igual que los métodos de generación de células TH⁺ se han beneficiado del conocimiento de los mecanismos que regulan la diferenciación de las NDA durante el desarrollo embrionario, el estudio de los mecanismos de guía de las NDA puede proporcionar información útil para diseñar estudios de la guía de axones en las células TH⁺ obtenidas de CTE.

Hasta ahora, el conocimiento que se tiene sobre la respuesta de las CTE-TH⁺ ante moléculas quimiotrópicas es muy limitado. Estudios previos han demostrado que las CTE derivadas a TH⁺ por el método de inducción de la diferenciación por células estromales PA6, podrían responder a Slit 1 de manera similar a las NDA del área ventral del mesencéfalo (Lin e Isacson, 2006).

En el presente trabajo se comparó la expresión de los receptores a Slit, Roundabout (Robo) en NDA mesencefálicas embrionarias y en CTE-TH⁺ obtenidas por el protocolo de 5 etapas (Lee et al., 2000) y posteriormente se analizó la respuesta quimiotrópica a Slit 1 de ambos tipos celulares.

1. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 DESCRIPCION ANATÓMICA Y FUNCIONAL DE LOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS

2.1.1 DISTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Las neuronas que sintetizan principalmente dopamina o células dopaminérgicas, expresan la enzima hidroxilasa de tirosina (TH) en altas concentraciones. La TH inicia la cadena de síntesis de dopamina al convertir la tirosina a L-3-4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa). Posteriormente, la descarboxilasa de ácidos aromáticos (AADC) transforma L-Dopa a Dopamina. Las neuronas dopaminérgicas también expresan el transportador de dopamina que es esencial para la recaptura de esta molécula. Estas enzimas han sido utilizadas como marcadores para detectar las neuronas dopaminérgicas y a partir de dicha detección se han logrado describir núcleos específicos en el encéfalo que principalmente contienen neuronas dopaminérgicas.

Se han descrito anatómicamente 3 núcleos dopaminérgicos ubicados en el tegmento ventral mesencefálico. Estos núcleos son: 1) El área Retro Rubral (RR) que contiene un 50% de neuronas que sintetizan dopamina y el resto no ha sido claramente definido; 2) La sustancia negra que a su vez se subdivide en sustancia negra pars compacta (SNpc) que posee un 95% de neuronas dopaminérgicas (NDA), la sustancia negra lateralis que contiene casi en su totalidad neuronas dopaminérgicas y la Sustancia negra reticulada que posee en su mayoría neuronas que sintetizan ácido gaba-aminobutírico (GABA) y algunas neuronas dopaminérgicas que proyectan profundamente en columnas en la SNpc y 3) El área ventral tegmental (AVT) la cual posee un 80% de neuronas dopaminérgicas y el resto son neuronas que sintetizan principalmente GABA (Bentivoglio y Morelli, 2005). Las NDA del área RR, que corresponden al grupo A8 de Dahlstrom y Fuxe (1964), proyectan al estriado formando parte de la vía negro-estrial y a estructuras límbicas y de la corteza cerebral formando parte de las vías mesolímbicas y mesocorticales. Las NDA de la SNpc (A9), proyectan principalmente al área dorsolateral del estriado, formando la vía negro-estrial. Las NDA del AVT (A10) proyectan principalmente al estriado, a estructuras límbicas y a la corteza, formando parte de los tres tractos dopaminérgicos principales del mesencéfalo (revisión en Germen y Wilson, 1996; Bentivoglio y Moreli, 2005) (ver Fig.1).

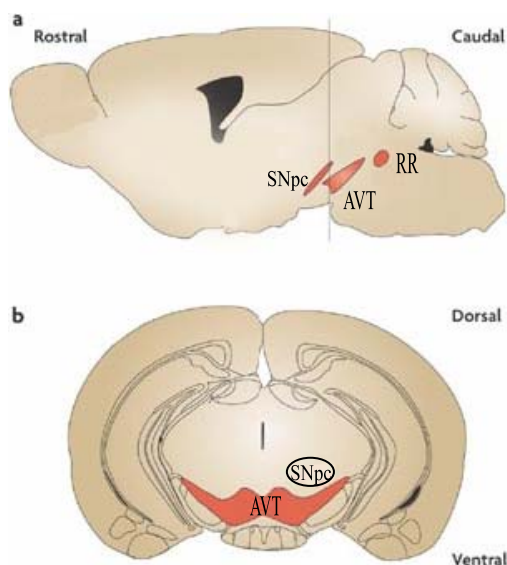


Fig. 1 Núcleos dopaminérgicos. a) vista lateral de encéfalo de rata donde se observa la distribución de los 3 núcleos dopaminérgicos RR, AVT y SNpc en el área ventral mesencéfalo. b) Corte coronal de encéfalo de rata donde se observa la distribución y posición de la SNpc y AVT. SNpc, sustancia negra pars compacta; AVT (area ventral tegmental) y RR, área retrorubral. Modificado de Schapira et al., 2006).

2.1.2 DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS Y LA FORMACIÓN DE LA VIA NEGRO-ESTRIAL

Durante el desarrollo embrionario del ratón y la rata se han estudiado algunas moléculas que inician el proceso de diferenciación de neuroblastos post-mitóticos hacia neuronas que posteriormente se especializan en la producción y liberación de dopamina. Particularmente, se sabe que existen señales morfogénicas que determinan las distintas regiones a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral y cuya intersección determinara la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo. La regionalización dorso-ventral está dada por la señal de la glicoproteína difusible Sonic hedgehog (Shh) que es secretada por la notocorda y por la placa del piso (PP) (Prakash y Wurst, 2007; [Roussa y Krieglstein, 2004](#)) y las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) 4 y 7 las cuales son expresadas por la placa del techo (PT) (Liem et al., 1997). La regionalización anteroposterior del mesencéfalo es determinado por las señales de 2 moléculas: la primera es Wnt1 secretada en la parte caudal del mesencéfalo y la segunda es el factor de crecimiento fibroblastoide 8 (FGF8) secretada por el organizador ítmico que se encuentra en los límites del cerebro medio (mesencéfalo) y del cerebro posterior (romboencéfalo) (Prakash y Wurst, 2007).

Wnt1 se requiere para el mantenimiento de la expresión del factor de transcripción Otx2 el cual se asocia con la expresión de los factores de transcripción Engrailed (En) 1 y 2 que son expresados, tanto en el borde caudal del mesencéfalo, como en la parte rostral del romboencéfalo. Por otra parte, FGF8 se requiere también para el proceso de diferenciación de neuronas dopaminérgicas en el área ventral del mesencéfalo y para la diferenciación de neuronas serotoninérgicas en la parte rostral del romboencéfalo. La expresión de estos factores comienza en el estadio embrionario (E) 8 y 8.5 del ratón (10-10.5 de la rata) (Prakash y Wurst, 2007). También se sabe que en E10.5 de rata, el factor de transcripción Nurr-1 (Nuclear related receptor-1) es expresado en células del área ventral del mesencéfalo y que para el día E11.5 hay la activación el factor de transcripción Ptx-3 que es expresado sólo en neuronas dopaminérgicas (Rao, 2003).

Durante el desarrollo embrionario de rata, los axones dopaminérgicos comienzan su proyección en dirección dorsal desde la región ventro-caudal del cerebro medio en E12. Posteriormente, los axones viran rostralmente (E12.5) y navegan a través del cerebro medio y el diencefalo durante E13 y E14 hasta alcanzar el estriado en el cerebro anterior en E15 formando la vía negro-estrial (ver Fig. 2) (Tamada et al., 1995, Nakamura et al., 2000, Gates et al., 2004). En E16 las neuronas dopaminérgicas ya han madurado, marcando el inicio del almacenaje, recaptura y liberación de dopamina. En E17 ya existe liberación de dopamina en el estriado (Gates et al., 2004; Rao, 2003).

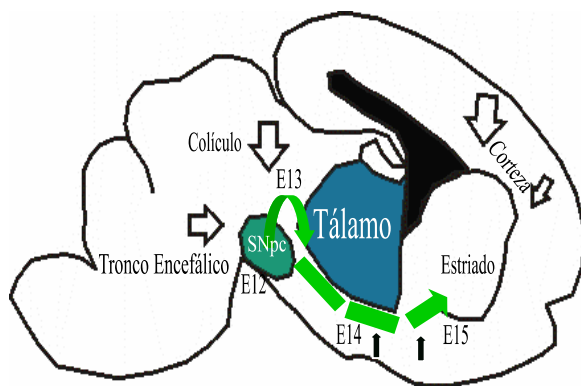


Fig. 2. Formación de vía Negro-Estrial en corte sagital de Rata. Se observa como los axones que proyectan de la Sustancia Negra pars compacta comienzan su proyección en el estadios E12 y posteriormente dan un viro rostral en E13. Posteriormente estos mismos axones navegan pro el diencefalo durante E14 hasta E15 cuando llegan al Estriado. Modificado de Gates et al., 2004.

En la formación de los diferentes tractos del sistema nervioso incluida la VNE, se han involucrado moléculas con actividad quimiotrópica que determinan la dirección del crecimiento axonal e incluso pueden detener el crecimiento. Estas moléculas son reconocidas por receptores transmembranales los cuales al unirse con un ligando específico activan cascadas de señalización involucrando a miembros de la familia de las GTPasas Rho; estas regulan la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, las que a su vez indicarán la polimerización o despolimerización de las fibras de F-Actina y como resultado de esto el movimiento del citoesqueleto (Dent y Gertler, 2003; Huber et al., 2003). En la sección siguiente se describen en más detalle las principales familias de moléculas que tienen efectos sobre axones en crecimiento así como aquellas que han sido implicadas en la formación de la VNE.

2.2 FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS QUIMIOTRÓPICAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Desde 1870, Santiago Ramón y Cajal, sugirió la existencia de moléculas con funciones quimiotácticas que guiaban a los conos de crecimiento de los axones, orientándolos y dirigiéndolos hacia sus células blanco. Esa idea ha sido confirmada en años recientes.

Durante el desarrollo embrionario, las proyecciones axonales de las neuronas atraviesan largas distancias para alcanzar sus blancos finales. En este camino, los conos de crecimiento localizados al final del axón detectan y responden, a través de receptores presentes en su membrana, a señales presentes en el medio extracelular. Las respuestas involucran diversas vías de señalización intracelular que eventualmente modifican la dinámica de polimerización de componentes del citoesqueleto como actina y tubulina, causando cambios asociados con el crecimiento y la direccionalidad de los axones. Las señales atrayentes o repelentes (Ver Fig. 3) están mediadas por moléculas quimiotrópicas ancladas a la matriz extracelular o por moléculas difusibles (Tessier-Lavigne y Goodman 1996).

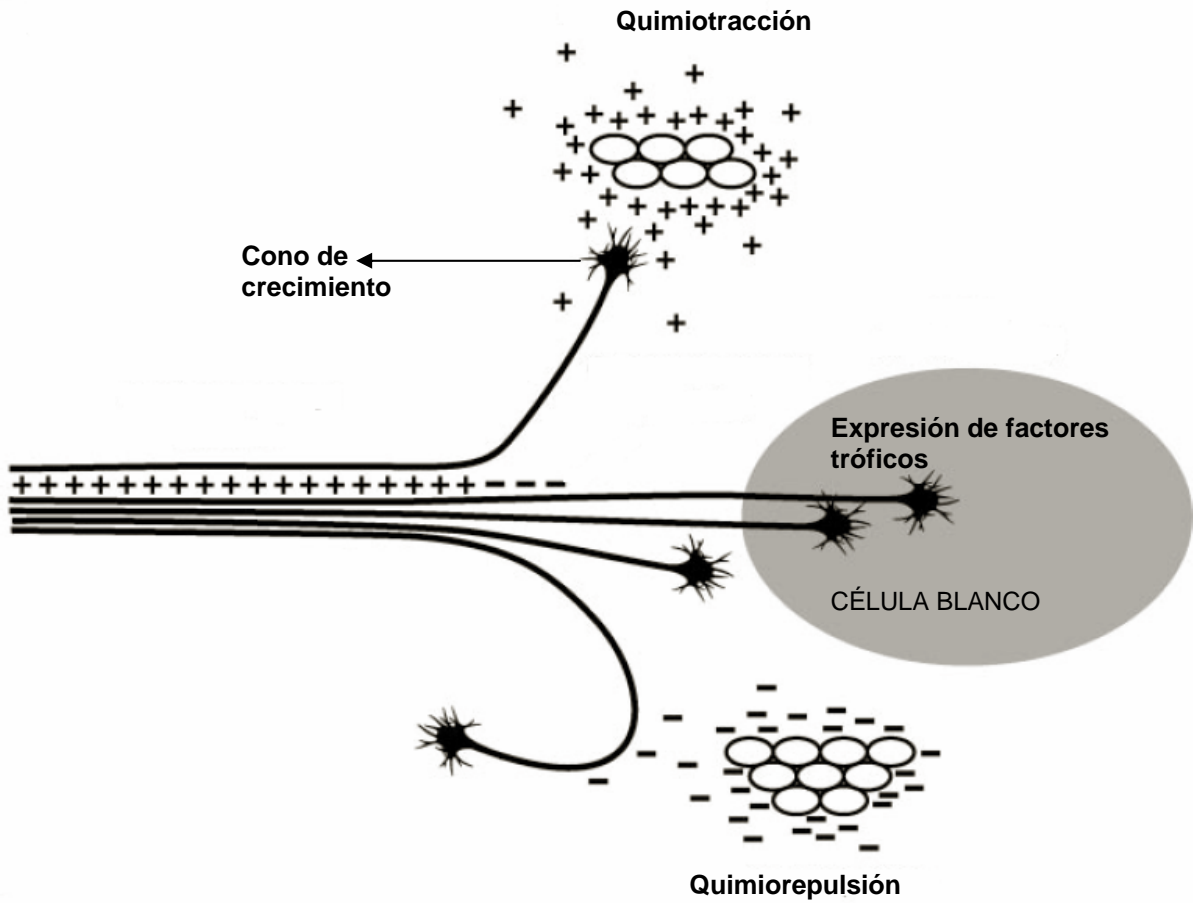


Fig. 3 Efecto de las moléculas quimiotrópicas sobre los axones. Modificado de Huber et al., 2003.

Algunas moléculas quimiotrópicas pueden actuar bifuncionalmente como atrayentes o repelentes, y aún no es claro de qué depende un efecto u otro. Sin embargo, se sabe que en algunos casos depende de la combinación de receptores y en otros de las vías de transducción de señal que se desencadenen. Los mecanismos de integración de información tampoco se conocen en su totalidad, pero se conocen diferentes familias de proteínas involucradas en la orientación del axón y sus receptores, así como algunas señales intracelulares que participan en la orientación del axón a su célula blanco (Huber, et al., 2003). Las familias de proteínas más estudiadas involucradas en la guía axonal son las Netrinas, Semaforinas, Efrinas y la familia de proteínas Slit.

2.2.1 NETRINAS

Las Netrinas son una familia de proteínas las cuales presentan una secuencia aminoacídica conservada similar a la de la proteína laminina (Kennedy et al., 1994; Serafine et al., 1994); Netrina-1 es la mejor caracterizada de esta familia y está implicada en la guía de proyecciones axonales diversas. Su receptor DCC (delated colorectal cancer) se ha relacionado tanto a efectos atrayentes como repelentes. Para que la actividad atrayente se lleve a cabo, Netrina-1 interactúa con el receptor DCC y se ha encontrado que este efecto es dependiente de altas concentraciones de AMP cíclico (Ming et al., 2007) para desencadenar la señal mediada por Rho GTPasa, Cdc42 y Rac-1. Para la actividad repelente que Netrina-1 desencadena con el cono de crecimiento, se requiere el heterodímero UNC-5-DCC y se desconoce la cascada de señalización que se desencadena para este efecto (Tessier-Lavinge y Goldman, 1996; Huber et al., 2003).

2.2.2 EFRINAS

Las Efrinas son proteínas ancladas a la membrana celular que interactúan con receptores transmembranales Eph. Sus receptores están divididos en 2 subclases, EphA (EphA1-EphA8) que interactúan con las Efrinas transmembranales A (EfrinA1 –EfrinA5) y los receptores EphB (EphB1-EphB6) que interactúan con Efrinas transmembranales B (EfrinB1-EfrinB3) (Huber et al., 2003). Para algunas Efrinas, se ha demostrado que ambos, tanto el receptor como el ligando, activan cascadas de señales en ambas direcciones asociadas con la activación de Rho GTPasas los cuales tiene diferentes adaptadores que pueden activar o inactivar la señal de efrinas como SHp2, Ephexin y el dominio de SH2, Nck. El efecto de estas moléculas en el cono de crecimiento puede ser de colapso o retracción (Elowe, et al., 2001; Shamah et al., 2001).

2.2.3 SEMAFORINAS

Las Semaforinas son una familia de proteínas secretadas y asociadas a membrana capaces de mediar efectos tanto repulsivos como atrayentes en los conos de crecimiento axonales durante el desarrollo. Existen más de 30 tipos de semaforinas las cuales se han clasificado en 8 subfamilias, y tiene en común compartir el dominio sema. Las semaforinas más estudiadas por su participación en el desarrollo del sistema nervioso central son las Semaforinas de clase 3. Las semaforinas de clase 3 se unen a neuropilina 1 y 2, la cual a su vez necesita formar un complejo

con otras 2 proteínas.; ese complejo es formado por PlexinaA/Neuropilina/L1 y se sabe que la presencia de estas 3 proteínas produce una unión de alta afinidad. (Kitsukawa et al., 1997; Kolodkin et al., 1997; Chen et al., 1998; Huber et al., 2003). Hasta ahora se sabe que las proteínas Rho GTPasas desencadenan la cascada de señal una vez que la semaforina se ha unido a su receptor. Particularmente, para la Semaforina 3A se sabe que una vez unido a neuropilina/Plexina, se activa la GTPasa Rac lo que estimula la unión de RND1 a Plexina; esta unión produce la inactivación de R-Ras la cual a su vez inactiva la unión de las integrinas a la matriz extracelular y por tanto la repulsión del cono de crecimiento (Vikis et al., 2000; Kruger et al., 2005).

2.2.4 SLITS

Las proteínas Slit (Slit 1, 2, 3) son una familia de moléculas secretadas que al interactuar con los receptores transmembranales Robo (Robo 1 y 2) promueven un efecto repelente en los axones, encontrando una unión redundante de estas moléculas con sus receptores. Se sabe que el dominio intracelular de Robo 1 se asocia con la proteína Abelson, la cual es una tirosina cinasa y con uno de sus sustratos Ena, las cuales están asociadas a la polimerización de F-actina para desencadenar las señales de Slit. (Lin et al., 2005; Sabatier et al., 2004; Brose et al., 1999; Brose et al., 2000 y Wang et al., 1999).

2.3 MOLÉCULAS QUIMIOTRÓPICAS INVOLUCRADAS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA VÍA NEGRO-ESTRIAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Estudios recientes han identificado algunas moléculas que parecen estar involucradas en el establecimiento de la vía negro-estrial durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, señales repulsivas de la placa del piso (Tamada et al., 1995) y otras moléculas ancladas en la zona ventral del cerebro medio (Nakamura et al., 2000) han sido implicadas en la guía axonal de NDA, sin embargo su naturaleza molecular aún no ha sido determinada. Hasta ahora solo hay información limitada que describe con precisión las señales que controlan las proyecciones axonales de las NDA durante el desarrollo. De acuerdo al patrón estereotípico de crecimiento de las NDA se podría suponer que, además de las señales ventrales repulsivas y las señales atrayentes del

diencéfalo, también podría haber señales que podrían estar gobernando el crecimiento de los axones de las NDA de forma rostral.

Yue y sus colaboradores (1999) mostraron la presencia del receptor EPHB1 y de su ligando EphrinB2 en neuronas de dopaminérgicas de la VNE, como de la vía mesolímbica y mesocortical. En este estudio probaron por medio de co-cultivo con una monocapa de células que expresaban EphrinB2, que neuronas dopaminérgicas de VTA, SNpc y SN lateralis eran inhibidas por EphrinB2. En este estudio presentan evidencias para creer que las Efrinas son un medio de regulación del crecimiento de los axones dopaminérgicos para que estos no superen los blancos en el estriado, donde también observaron la expresión del ligando para EPHB2.

Por otra parte, estudios de nuestro laboratorio se han obtenido evidencias que sugieren que las Semaforinas de la clase 3 tienen una función en la guía axonal y en el establecimiento de la vía negro-estriada. Mediante hibridaciones *in situ* se ha mostrado la expresión de Semaforina (Sema) 3C y Sema 3F en el pretectum y Sema 3A en el estriado en embriones de rata E13. Por otra parte, mediante explantes de mesencéfalo de embriones de rata (E13), expuestos a células de la línea HEK293 (células embrionarias de riñón humano 293) transfectadas con diferentes vectores de expresión para Semaforinas, se observó que Sema 3C y 3A tenían efectos atractivos y que Sema 3F presentaba efectos repulsivos sobre las neuronas TH⁺. Lo anterior sugiere que las semaforinas pueden estar participando en la proyección de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio al estriado durante E13 (Hernández-Montiel et al., en prensa).

2.3.1 IMPORTANCIA DE LA MOLÉCULA SLIT EN LA FORMACIÓN DE LA VÍA NEGRO-ESTRIADA.

La molécula difusible Slit (ver figura 4), ha sido involucrada en la formación de diferentes tractos, como el tracto olfatorio lateral (Nguyen-Ba-Charvet y Chedotal, 2002 y Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002), la migración de neuronas de la zona subventricular repeliendo a las neuronas de áreas ventrales para su llegada hacia el bulbo olfatorio en áreas postero-rostrales (Chen et al., 2001), la prevención de cruce de la línea media y el desplazamiento dorsal de tractos tálamo-corticales debido a que la ausencia de Slit 1 y 2 genera cruces aberrantes de la línea media y un desplazamiento dorsal (Bagri, 2002). Por lo anterior se considera a esta molécula como una

clave indispensable para el correcto desplazamiento ventral de los axones, así como para el direccionamiento migratorio de algunos grupos neuronales.

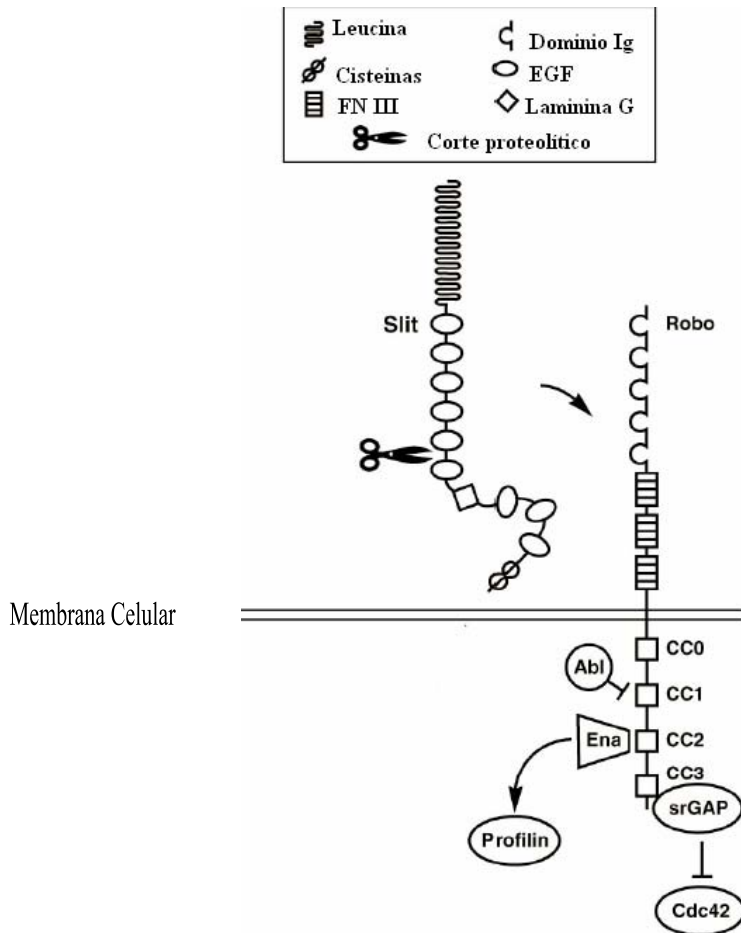


Fig 4. Representación de la molécula Slit y la interacción con su receptor Robo. Modificado de Huber et al., 2003.

Marrillat y colaboradores (2002) demostraron, por medio de hibridación *in situ* en cerebro de rata, la presencia de mRNA para Slit 1, 2 y 3 y sus receptores Robo 1, 2 y 3, en diferentes estadios y estructuras que forman la vía negro-estrial. Específicamente, en este estudio se observó que Slit 1 se encuentra desde E15 hasta etapas adultas en el Colículo superior e inferior. En la sustancia negra, la presencia del mRNA de Slit 1 se encuentra en el estadio post natal 10 (P10) y adulto. En el Caudado, el Globo Pálido y el Putamen la presencia de mRNA de Slit 1 fluctúa, apareciendo de E15 a E18, ausentándose en E20 y volviéndose a presentar en estadio postnatal (P0) y en la etapa adulta. En cuanto a la sustancia negra, el mRNA de Slit 2 sólo se presenta en estadio adulto y Slit 3 en P5 y en el adulto. En cuanto a los receptores Robo 1 y 2, su mRNA se presenta de forma continua en la sustancia negra desde E15 hasta etapas adultas. En el caudado,

el globo pálido y el putamen, Robo 1 y 2 se presentan sólo en E15 y E18; posteriormente, sólo en el globo pálido en estadio P0. En el colículo superior la presencia de mRNA de Robo 2 se presenta constante desde E15 hasta estadio adulto, mientras que Robo 1 se presenta de E15 hasta P0. Estos hallazgos revelan que Slit, junto con sus receptores, están presentes en diversas estructuras relacionadas con la vía negro-estrial (Marrilat et al., 2002).

Por su parte, Bagri y colaboradores (2002) reportaron que Slit 1 y Slit 2 previenen el crecimiento de axones dopaminérgicos en área ventrales ya que en ratones carentes (“Knock out”) de Slit 1 y 2, se observó que los axones que forman los tractos tálamo-corticales presentaban proyecciones ventralizadas, lo que supone una función dorsalizante de dichas moléculas durante el desarrollo en mamíferos

Por otro lado, Lin y colaboradores (2005) mostraron mediante inmunotinciones en células TH⁺, obtenidas de la zona ventral del mesencéfalo de embriones de rata de E14, la presencia del receptor DCC. Los axones de estas células fueron atraídas por Netrina 1. Lo anterior sugiere que estas moléculas (tanto el receptor como el ligando) tienen una importancia en el establecimiento de la vía negro-estrial en este estadio embrionario. Recientemente, este mismo grupo (Lin e Isacson, 2006) demostró que células TH⁺ obtenidas *in vitro*, mediante la diferenciación con células estromales PA6, poseen los receptores Robo 1, 2 y DCC, y que no responden a Slit ó Netrina de forma similar a explantes de mesencéfalo. Específicamente mostraron que Slit 1 y 3 producen inhibición y repulsión del crecimiento de neuritas en NDA embrionarias, Netrina 1 induce el crecimiento de neuritas y Slit 2 produce repulsión de los axones. En experimentos adicionales mostraron que los axones de neuronas TH⁺ obtenidas *in vitro* no son repelidos por Slit 1 y 2 pero su crecimiento si es inhibido.

2.4 DEGENERACION DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS: ENFERMEDAD DE PARKINSON

La degeneración de las NDA en humanos causa una disminución de dopamina en el estriado dorsal, produciendo la enfermedad de Parkinson (EP), la cual es un desorden del movimiento progresivo y degenerativo (Drucker-Colin y Verdugo-Díaz, 2003; Cardoso et al., 2005; Moore et al., 2005). Dicha enfermedad está caracterizada clínicamente por temblor, rigidez, movimientos lentos, inestabilidad de la postura (Cardoso et al., 2005) y algunos síntomas no motores como incapacidad cognitiva y trastornos conductuales como depresión, ansiedad y fatiga (Ferreri et al., 2006).

Basado en la citoarquitectura y la melanización, Hassler (1927, revisado en Rao, 2003) dividió la sustancia negra en varias secciones y determinó basado en sus observaciones que la SN ventral y la SN lateralis se degeneraban en las primeras etapas de la EP. Recientemente, por medio de estudios PET (Tomografía por emisión de positrones) y SPECT (Single photon emission computed tomography) se ha observado que por año, el rango de recaptura de dopamina disminuye de un 6-13% en pacientes con EP y del 2.5% en personas sanas (Rao, 2003). Los síntomas motores se desarrollan al alcanzar una degeneración del 75% de las NDA de la SNpc; estos síntomas se asocian a la regulación que estas neuronas realizan en los ganglios basales.

Las principales estructuras de los ganglios basales son el tálamo (núcleo ventral anterior y ventro lateral), el Caudado-putamen (estriado), el globo pálido (parte interna y externa), el núcleo subtalámico y la SN (pars compacta, reticulada y lateralis). Los ganglios basales o núcleos de la base son el mayor sistema neural que recibe aferencias de la corteza y que tiene eferencias a ella vía el mesencéfalo y el tálamo. Casi todas las áreas corticales envían aferencias hacia los ganglios basales, incluyendo el lóbulo frontal, parietal, temporal y estructuras límbicas. Las principales aferencias son dirigidas por la corteza frontal, incluyendo la prefrontal, premotora y la corteza motora suplementaria. Estas aferencias talámicas ascienden paralelamente con tractos cerebelares a través del tálamo hacia la corteza motora primaria (Gerfen y Wilson, 1996). Por tanto, la degeneración o pérdida en uno de los núcleos que participan en los ganglios basales, como la SNpc produce una alteración en las señales que se dirigen del mesencéfalo a la corteza. La

etiología celular de la degeneración de la SNpc es aún desconocida. Sin embargo, se tienen algunas nociones de cómo podría iniciar dicha pérdida selectiva por alteraciones genéticas y de funcionamiento de algunas proteínas.

2.4.1 ETIOLOGIA DE LA DEGENERACIÓN DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SUSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA

Existen diferentes etiologías asociadas a la EP, sin embargo, aún no se sabe con precisión el mecanismo por el cual las NDA se degeneran y mueren sólo en la SNpc. La EP se asocia principalmente con la acumulación de agregados de proteínas fibrilares que forman cuerpos de Lewy en el citoplasma, en dendritas y en axones. Estos agregados promueven la muerte celular de las NDA de la SNpc. El mecanismo genético-molecular de esta acumulación se ha asociado a la mutación de varios genes entre los cuales se encuentran los que codifican para las proteínas α -Synucleína, DJ-1, Parkin, PINK, así como en UCHL1 lo que conlleva a deficiencias en el sistema ubiquitina-proteosoma (ver Fig. 5). Por otro lado, también se ha atribuido dicha degeneración al estrés oxidativo el cual puede generar la presencia de radicales libres en exceso y generar también la muerte de estas células que se consideran particularmente susceptibles a dichos cambios (Moore et al., 2005, Cardoso et al., 2005).

En pacientes con EP se han encontrado mutaciones en diferentes regiones del gene que codifica para la proteína fibrilar α -Synucleína, que forma parte del citoesqueleto; aún no se conoce la función específica de ésta, pero se sabe que su forma mutada se acumula en el citoesqueleto formando agregados (Cabin et al., 2002). La liberación de radicales libres se asocia a la acumulación de α -Synucleína y por tanto exacerba la toxicidad en la célula llevándola a apoptosis por el mecanismo dependiente de las caspasas (Scherer et al., 2002).

La mutación en el gene DJ-1 causa una forma autosómica recesiva de EP. Se han encontrado más de 10 isoformas de DJ-1 que son responsables de la oxidación de cisteínas y de metilación de algunas proteínas, lo que conlleva a la acumulación de proteínas en el citoesqueleto (Choi et al., 2006). Se cree que la proteína codificada por este gene está involucrada en oncogénesis y en infertilidad en ratas; se le ha atribuido también un papel de sensor del estrés oxidativo (Klein y Schlossmacher, 2006).

Otra de las mutaciones asociadas a EP es la del gene UCHL1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1), que participa en el sistema proteosoma-ubiquitina (UPS); la mutación más común es en la proteína E3 ligasa llamada Parkin. Por otra parte, la mutación del gene para la proteína Parkin hace que ésta altere su localización, agregándose en un solo lugar; esta mutación es responsable de la enfermedad de Parkinson juvenil (Sakata et al., 2003).

La EP también se ha relacionado con mutaciones en la proteína cinasa PINK1 (PTEN-induced cinasa), una proteína mitocondrial que causa alteraciones en el sitio de unión para ADP alterando la actividad cinasa; además, esta proteína está relacionada con la protección ante estrés oxidativo a través de su función fosforilativa (Valente et al., 2004).

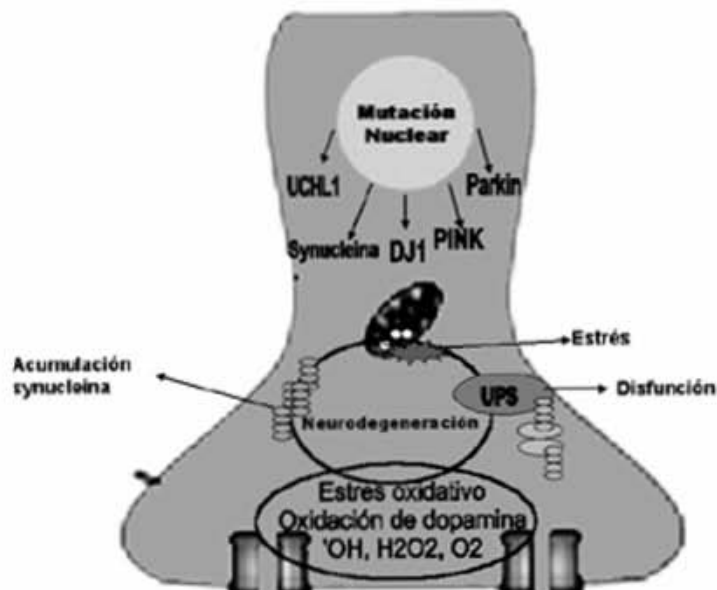


Fig. 5 Proteínas asociadas a la degeneración de las NDA en la enfermedad de Parkinson. Mutaciones nucleares de UCHL, Synucleína, DJ1, PINK y Parkin se asocian a la acumulación proteica que degenera las NDA en la EP. Alteraciones en otros mecanismos como el estrés oxidativo y el sistema UPS también se han asociado a la EP. Modificado de Cardoso et al., 2005.

Un análisis post-mortem de pacientes con EP mostró que la SNpc presentaba mayor susceptibilidad ante la demanda oxidativa, ya que la dopamina (por vía de la enzima monoamino oxidasa) puede auto-oxidarse en diferentes sustancias que son tóxicas para la célula como los derivados de quinona-dopamina y como el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno

puede convertirse en un radical más reactivo catalizado por hierro el cual es abundante en esta estructura (Youdim, 2003).

Otra disfunción asociada directamente con EP es la presentada en las mitocondrias por la alteración en la cadena de transporte de electrones en los complejos I y III por la coenzima tetrahidrobiopterina (BH4). La BH4 es un co-factor de la enzima TH para la síntesis de monoaminas y se ha demostrado in vitro que su administración produce toxicidad, lo que conlleva a la elevación de radicales libres; esto conlleva a la producción de quinonas a partir de dopamina lo que produce adelgazamiento de la membrana mitocondrial y muerte celular (Choi et al., 2005). Se ha encontrado en pacientes con EP una disminución de la Co-enzima Q10, que provee los electrones a la cadena respiratoria en los complejos I y III, y secuestra o elimina los radicales libres (Shults et al., 1997).

2.5. LA SUSTITUCIÓN CELULAR COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO PARA LA AUSENCIA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA VÍA NEGRO-ESTRIAL

Se han desarrollado diversas alternativas de tratamiento para la EP, entre las cuales se encuentran las lesiones quirúrgicas que consisten en seccionar la cabeza del núcleo caudado y las fibras palido-fugales, realizar talamotomías, así como la lesión del asa reticularis. Lo anterior ha permitido que un 37% al 40% de la población tratada disminuya o elimine la rigidez y los temblores provocados por la degeneración de las NDA de la SNpc (Samuel y Lang, 2003). Posterior a esta alternativa, surgió la administración de fármacos, los cuales funcionan como agonistas de dopamina tales como la anfetamina, Ropinirole, Pramipexole y Pergolide, entre otros, compensando por algún tiempo los temblores y la rigidez. Sin embargo, estos fármacos generan una respuesta adaptativa en el 25 al 90% de los pacientes lo que hace necesario seguir aumentando la dosis. Después de 6 meses de ingesta de estos fármacos se generan problemáticas en áreas renales, hepáticas, náuseas, vómito, mareos y desorientación (Santigo y Factor, 2003).

Otro de los tratamientos es la estimulación cerebral profunda, la cual consiste en colocar electrodos vía intracraneal hasta penetrar a los núcleos asociados a los ganglios basales. Los núcleos blanco para dicha estimulación son el núcleo subtalámico, el tálamo y el globo pálido interno, los que por medio de pequeños choques eléctricos regulados, imitan en algunos aspectos

la función normal de las células dopaminérgicas. Este tipo de alternativas ha producido lesiones más severas en las áreas estimuladas, generando consecuencias de inmovilidad e infecciones severas en el 30% al 55% de los pacientes (Pahwa y Lyons, 2003).

Por último, se ha dado la posibilidad de hacer implantes de células para compensar la carencia o ausencia de una función celular lo cual se denomina Sustitución Celular. Ésto implica que células colocadas en áreas específicas del encéfalo pueden realizar las funciones de aquellas que se han degenerado, siempre y cuando éstas sean colocadas en lugares estratégicos, que hasta ahora en los pacientes con EP ha sido el estriado.

Desde 1890 se ha reportado la posibilidad de realizar transplantes de tejido neural en el encéfalo (Thompson, 1890) Estudios recientes muestran que las células fetales mesencefálicas transplantadas pueden sobrevivir hasta 10 años, reactivar las funciones del estriado y detener el avance de la enfermedad (Lindvall y McKay, 2003). Estudios post-mortem en pacientes transplantados con tejido fetal de mesencéfalo han revelado la sobrevivencia del 15 al 30% de células transplantadas en el estriado. Sin embargo, el acceso al tejido fetal ha sido un obstáculo en este procedimiento pues se necesitan aproximadamente de 3 a 4 fetos productos de abortos, de entre 3 a 6 semanas de gestación, para realizar el procedimiento (Mendez et al., 2005).

Otra de las alternativas ha sido el uso del linaje de células simpático-adrenales (SA), las cuales se caracterizan por dar lugar tanto a neuronas simpáticas, células pequeñas intensamente fluorescentes (PIF) que pertenecen al ganglio simpático y médula adrenal, como a células cromafines que forman el ganglio parasimpático y médula adrenal. Todos estos tipos celulares han sido usados en transplantes en modelos animales de EP, y algunas de ellas en pacientes, debido a que todas las progenitoras SA pueden expresar la enzima TH, y por tanto liberar dopamina. Cuando estas células SA presentan un estado más avanzado de diferenciación tienen la capacidad de sintetizar monoaminas; 80% de la población libera epinefrina, 20% noradrenalina y un 1% de cada una de las poblaciones libera también dopamina. Las células PIF expresan factores como GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales) y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), que protegen a las NDA de la degeneración. Algunas de las células del linaje SA han sido usadas en el tratamiento de pacientes a los que se les administra Levodopa, obteniendo alivio de algunos de los síntomas de EP. Una de las ventajas esenciales de estas células es que al ser auto transplantadas al paciente, no presentan rechazo inmunológico.

Sin embargo, el tiempo de supervivencia de este linaje celular posterior a los trasplantes en modelos animales con EP es de 2 a 10 semanas, por lo que generalmente no son consideradas como una fuente potencial para este tipo de tratamientos, sino como una fuente que se emplea paralelamente con tratamientos alternativos de Levodopa exógeno (Fernández-Espejo et al., 2005).

2.5.1. LAS CELULAS TRONCALES EMBRIONARIAS COMO UNA ALTERNATIVA DE SUSTITUCION DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS.

Las células troncales (CT) son aquellas con la capacidad de autorrenovarse en estado indiferenciado y de dar origen a diferentes tipos celulares terminalmente diferenciados. Un modelo que se ha propuesto para explicar la autorrenovación y la simultánea diferenciación de CT es el de la división asimétrica, lo que lleva a que durante la mitosis, una célula hija puede permanecer como CT y la otra seguir una vía de diferenciación. Se ha asociado a la proteína PEM con este proceso, ya que se ha observado la acumulación del mRNA de PEM en el cuerpo de atracción del centrosoma en las células que inician un proceso de diferenciación (Munro, 2007). Las CT pueden dividirse en: totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales. Se conoce como CT totipotenciales a aquellas capaces de producir cualquier tipo celular, dentro y fuera del embrión, para así formar un organismo en su totalidad. En esta categoría caen el cigoto y células presentes hasta el embrión de 8 células. Las CT pluripotenciales pueden dar origen a células dentro del embrión, incluyendo neuronas y células musculares, pero no formar un organismo en su totalidad, ya que no pueden dar origen a células de tejido extraembrionario (trofoblasto); estas células pueden ser las células troncales embrionarias (CTE) obtenidas de la masa interna del blastocisto y las células embrionarias germinales obtenidas de los precursores de las células germinales (CPG). Por último, las células multipotenciales sólo dan origen a células de tejidos específicos como las CT obtenidas de tejidos adultos (Fig. 6).

Dichas potencialidades se pueden observar en los estadios embrionarios de los mamíferos. Durante los primeros días del desarrollo las células que forman la mórula (estadio de 8 células) son totipotentes; en un estadio posterior se observa el blastocisto, que contiene una masa interna de células pluripotentes denominada embrioblasto (Boy et al., 2005); en estadios subsecuentes,

ocurre la gastrulación, durante la cual a partir de las células de la masa celular interna se generan las tres capas germinales: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Del ectodermo, por ejemplo, se forma posteriormente la placa neural cuyas células tienen capacidad multipotente ya que sólo pueden dar lugar a linajes neuronales y gliales del sistema nervioso central llamadas células precursoras neurales (CPN) (Baizabal, et al 2003).

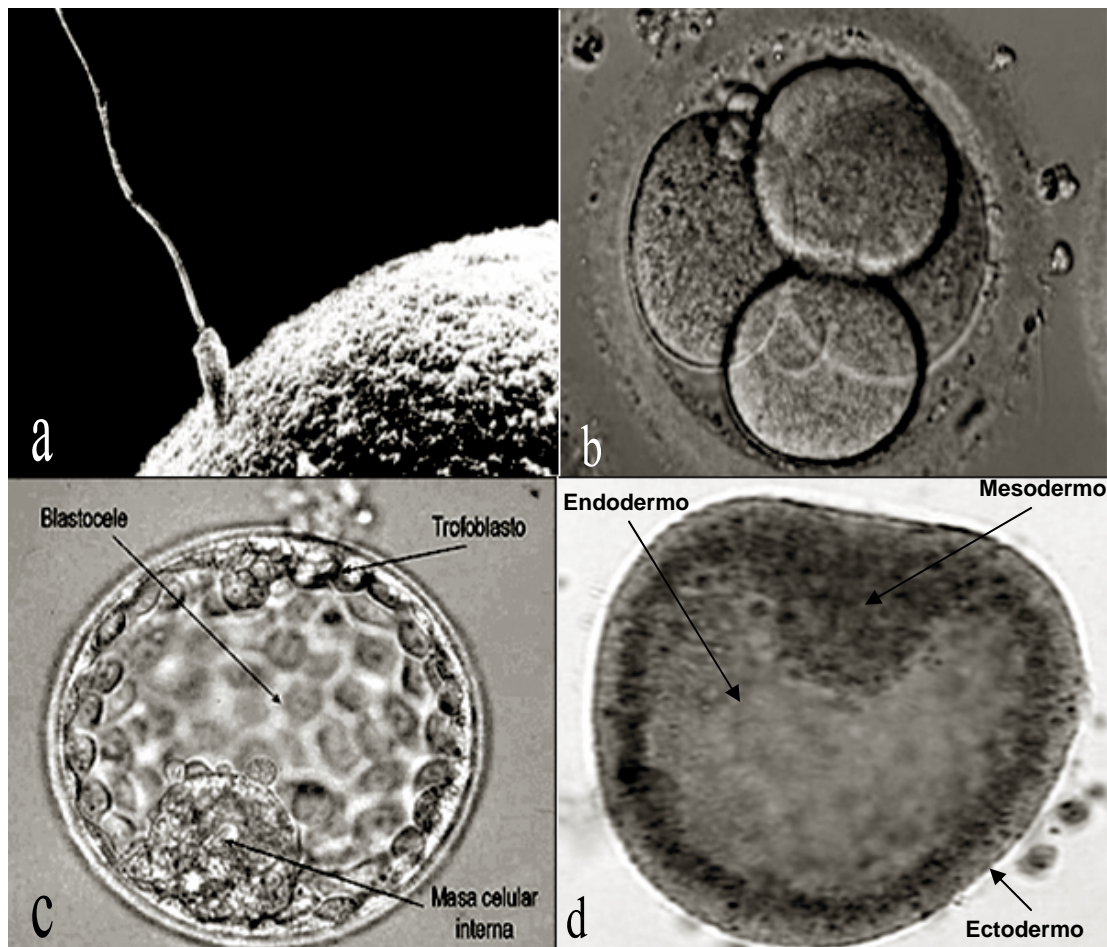


Fig. 6. Obtención de CT en diferentes estadios del desarrollo humano. CT totipotentes: a) el cigoto, resultado de la unión de las células germinales; b) Primeras 4 células después de la fertilización. c) Las CTE pluripotentes se derivan de la masa interna del blastocisto. d) Después de la gastrulación se forman las 3 capas germinales, de las que se pueden aislar células troncales multipotentes.

Particularmente, las células troncales embrionarias (CTE) al ser células pluripotentes, se caracterizan por: 1) poseer un amplio potencial de diferenciación, lo que implica que pueden iniciar un proceso de expresión génica hacia cualquier linaje celular y una proliferación teórica

ilimitada en cultivo, repitiendo el ciclo celular indefinidamente (Ohtsuka y Dalton, 2007; Baizabal et al., 2003; Boyd et al., 2005) (Ver Fig. 7). Para mantener dicha pluriotencialidad, las CTE dependen de diversas señales. Para las CTE de ratón particularmente, se sabe que las señales implicadas en el mantenimiento de este estado son desencadenadas por LIF (Factor inhibidor de leucemia) que parece actuar sobre el gen c-myc para mantener el estado indiferenciado y de proliferación (Ohtsuka y Dalton, 2007).

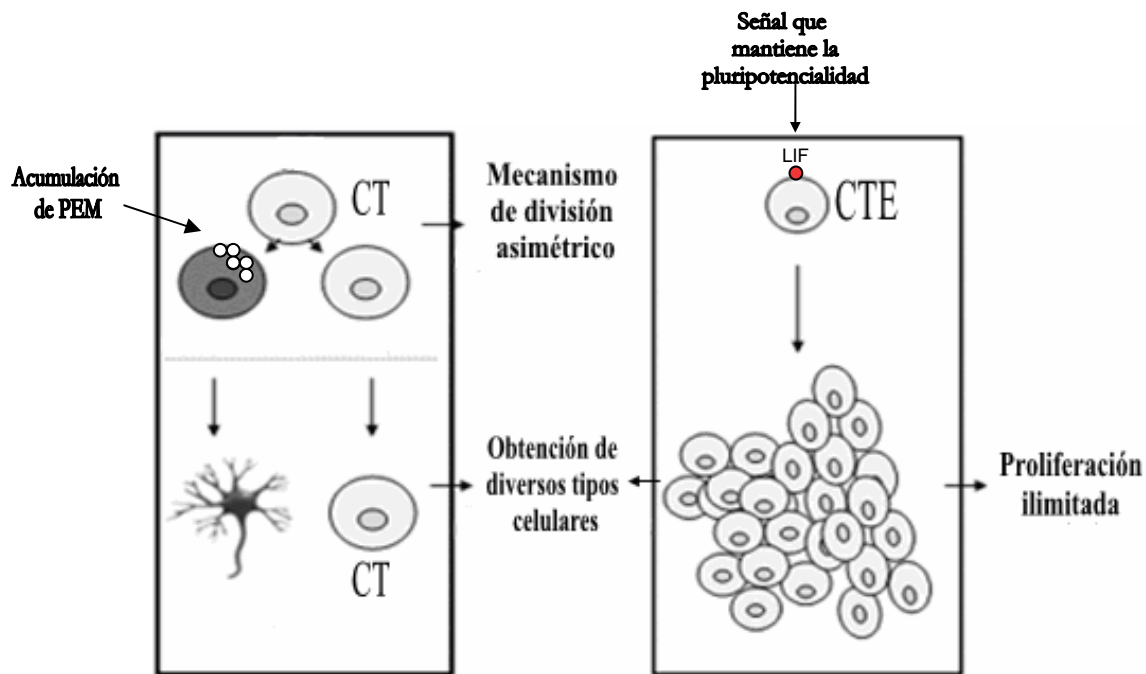


Fig. 7. Características de las CT y CTE. Por medio de mecanismo de división asimétrico se pueden obtener células que mantienen su estado de indiferenciado y células comprometidas a un proceso de diferenciación. Se pueden obtener diversos tipos celulares por medio de la expresión de diversas proteínas. Proliferación ilimitada: a partir de una CTE de ratón pueden obtenerse una gran cantidad de CTE sin perder su propiedad de célula indiferenciada por la presencia de LIF. Obtención de diversos tipos celulares: se pueden obtener hasta el momento, casi todos los tipos celulares como neuronas dopaminérgicas (Ohtsuka y Dalton, 2007; Baizabal, et al. 2003).

Las CTE son una fuente de obtención de neuronas TH⁺, debido a que al implantarlas *in vivo* o someterlas *in vitro* a un proceso de diferenciación, se pueden obtener grandes cantidades de neuronas TH⁺ (Bjorklund et al., 2002; Kim et al., 2002, Pan, et al., 2003).

Recientemente, Bjorklund y colaboradores (2002), demostraron que al implantar CTE indiferenciadas en el estriado de ratas se obtenía el 50% de TH⁺ del total de células implantadas, logrando la reactivación del área dorsal del estriado, reducción de la asimetría motora y

restauración de la función física, además de incrementar la actividad eléctrica en el área trasplantada. Sin embargo, un 30% de las ratas trasplantadas murieron al final del estudio, pues desarrollaron teratomas, los cuales son tumoraciones que presentan células indiferenciadas y diferenciadas que pertenecen a las 3 capas germinales. Isacson et al. (2003), demostraron por medio de tomografía por emisión de positrones que al implantar CTE en el Estriado de ratas, se reactivaba el estriado cuando daban un reto con anfetamina (el cual induce la liberación de dopamina) y posteriormente demostraron que estas células implantadas eran TH⁺.

Se han reportado diversos métodos *in vitro* para la obtención de neuronas TH⁺ a partir de CT. Entre ellos se encuentra el uso de las Células Embrionarias Germinales (CEG). Las células CEG provienen de las CPG, y tienen la propiedad de dar lugar a diferentes tipos celulares, incluidas las NDA (Pan et al., 2003). Sin embargo, en estudios en roedores se ha demostrado que las células CEG originarias y las cultivadas presentan huellas genómicas diferentes, por lo cual pueden tener alteraciones en la estabilidad de diferenciación (Rohwedel et al., 1996). Otro método reportado es mediante la formación de neuroesferas, las cuales son agregados celulares obtenidos *in vitro* a partir del cultivo de células precursoras neurales. Estas células pueden obtenerse de un período de diferenciación embrionario más tardío, donde el tubo neural ya ha comenzado a formarse o incluso de la zona subventricular del cerebro adulto. Sin embargo, en este tipo de métodos proliferan diversos tipos celulares, principalmente astrocitos, obteniéndose sólo un 5% de neuronas TH⁺. Sumado a lo anterior, las neuroesferas generadas poseen un potencial de proliferación y de diferenciación restringido (Baizabal, et al., 2003). Otro método descrito es el uso de CTE que provienen de la masa interna del blastocisto y se han utilizado para obtener células TH⁺ tanto *in vitro*, como *in vivo* (Kim et al., 2002, Lee et al., 2000, Bjorklund et al., 2002, Fluckiger, et al 2003, Yoshizaki et al., 2004).

Para la obtención de las neuronas TH⁺ a partir de CTE se han descrito 2 procedimientos. El primero de ellos conocido como de 5 etapas, utiliza la formación de cuerpos embrionarios y selección de precursores neurales (Lee et al., 2000). En este protocolo se adicionan a diferentes tiempos factores morfogénicos como FGF8, Shh y el mitógeno FGFb (Factor de crecimiento Fibroblastoide básico) (Roussa y Krieglstein, 2004). El segundo procedimiento, utiliza la inducción de la diferenciación por medio de células estromales PA6 (Kawasaki et al., 2000) y la

adición de los mismos factores morfogénicos que el primero (Yoshizaki et al., 2004; Barberi et al., 2005, Kim et al., 2006). Se ha caracterizado la expresión de diversas proteínas en las neuronas TH⁺ generadas por ambos procedimientos. Las neuronas TH⁺ obtenidas mediante el primer método, expresan la enzima descarboxilasa de ácidos aromáticos-L (AADC), Calretinina, DAT y β -tubulina (neurofilamento) (Chung et al., 2002), Ptx-3 y Engrailed 1 (Kim et al., 2002). En el segundo procedimiento se ha caracterizado la expresión de AADC, DAT, calbindina, la proteína G acoplada al canal de potasio de corriente rectificadora (Girk2) y Ptx-3 (Kim et al., 2006). En ambas, la transfección de las CTE con Nurr-1 aumenta la generación de células TH⁺ en 5 veces en comparación con las CTE nativas y la caracterización electrofisiológica muestra un patrón de liberación de dopamina similar al de las NDA adultas donde se implantaron. También, el trasplante de células TH⁺ generadas por ambos procedimientos de diferenciación producen una mejora significativa de la asimetría motora presentada en los modelos de EP, así como la ausencia de teratomas después de 8 y 4 semanas respectivamente, mostrando integración del implante en el estriado (Kim et al., 2002; Yoshizaki et al., 2004). Recientemente Rodríguez-Gómez y sus colaboradores (2007) demostraron que, CTE diferenciadas in vitro bajo el procedimiento de 5 pasos sobrevivían después de 32 semanas de trasplante, encontrando por medio de pruebas de rotación y PET la integración de las células al estriado. Así mismo, demostraron que las células implantadas expresaban marcadores como Lmx1b, En-1 y Foxa característicos de NDA mesencefálicas. Lo anterior contribuye a la idea de que las CTE son una fuente importante de obtención de NDA para tratamientos de sustitución celular en EP.

2.5.2 PROBLEMÁTICAS CENTRALES EN LAS TERAPIAS DE SUSTITUCIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

La supervivencia de las células transplantadas es uno de los principales problemas en los tratamientos con sustitución celular para la EP. Se ha reportado la supervivencia del 5 al 10% de células de tejido fetal de mesencéfalo después de 6 a 10 años de ser transplantadas en humanos (Drucker-Colin y Verdugo-Díaz, 2003, Isacson et al., 2003). En modelos de EP en ratas y primates, la supervivencia de los trasplantes de células cromafines (Fernández-Espejo et al., 2005) y de tejido fetal de mesencéfalo ha sido no mayor al 5% y alrededor de 3 meses posterior al trasplante (Lindvall y Bjorklund, 2004; Takagi et al., 2005). El porcentaje restante de células implantadas (90%), tanto en neuronas extraídas de mesencéfalo como de ganglios simpáticos, mueren por apoptosis al momento de ser implantadas. Marchionini y colaboradores (2003)

reportan que el fenómeno de muerte celular proveniente de tejido fetal de mesencéfalo puede ser debido a la carencia de moléculas de adhesión presentes en las células transplantadas.

Por otro lado, las CTE implantadas sin diferenciar generan teratomas, aunque se observa una supervivencia mayor en comparación con las TH⁺ obtenidas de tejido fetal o de glándula adrenal. En un estudio realizado por Parish y colaboradores (2005), demostraron que la proteína cripto, implicada en la activación de la proliferación y diferenciación hacia células TH⁺, al parecer está involucrada en la formación de teratomas, ya que células knock-out para la proteína cripto (cripto -/-) diferenciadas a TH⁺ e implantadas en un modelo de EP en rata, se integraban en un 80%, mostraban recuperación de los síntomas y no generaban ningún teratoma. Por otro lado, las CTE Cripto +/+, generaron teratomas a la séptima semana del trasplante. Además, en este estudio se muestra que la diferenciación *in vitro* de células TH⁺ provenientes de Cripto -/- se incrementaba en un 102% en comparación con las TH⁺ Cripto +/+, ya que permite la expresión de proteína Nurr-1 al activar el gene de Wnt-1 que se sabe está relacionado con la diferenciación hacia neuronas TH⁺. Por otro lado, se ha observado que la previa diferenciación *in vitro* de las CTE disminuye o elimina la posibilidad de teratomas. Así, Kim y colaboradores (2002 y 2006) demostraron que implantes intra-estriales de CTE previamente transfectadas con Nurr-1 y diferenciadas a TH⁺, no produjeron teratomas después de varias semanas de su implante en modelos de EP (ratas y ratones) con lesiones unilaterales con 6-HODA (6-hidroxi-dopamina).

De las células que sobreviven en los trasplantes se deriva un problema más a resolver, la innervación correcta del estriado por las neuronas implantadas. Como se mencionó al principio, anatómicamente se da la clasificación de A8, A9 y A10 a las neuronas dopaminérgicas de acuerdo a sus aferencias, a la expresión particular de proteínas y a su localización en el área ventral del mesencéfalo (VM). En implantes hechos en el estriado se observa que las neuronas que son negativas a CCK, positivas a Girk-2 y a TH (A9), presentan comportamiento correcto hacia el estriado y que expresan factores similares a las neuronas de la SNpc. Sin embargo, aquellas neuronas que son positivas a CCK/TH (A10), no muestran una extensión axonal apropiada hacia las zonas corticales ya que son similares a las neuronas de la AVT (lo que sería su función normal). Otro factor determinante en NDA es el ácido retinoico que se sintetiza por una enzima AHD2 (aldehído deshidrogenasa 2), que sólo se expresa en las neuronas A9; estas

neuronas proyectan sus axones hacia la zona dorsal y rostral del estriado y reducen las extensiones axonales de las NDA en zonas ventrales (Isacson et al., 2003). Se ha encontrado en implantes intraestriales hechos en ratas, que las neuronas TH/AHD2⁺ derivadas de explantes de VM E16 no generaran diskinesias, lo que normalmente ocasionan las TH/AHD2⁻, pues generan una activación inadecuada y exacerbada como lo observado con tratamientos con Levodopa (precursor de dopamina) (Haque et al., 1997). En estudios posteriores en implantes hechos en ratas, se observa por tomografía por emisión de positrones, que la actividad de las CTE indiferenciadas e implantadas intra-estrialmente, muestran una actividad adecuada del estriado con un reto de anfetamina, lo que implica una innervación correcta de estas células que se diferenciaron in situ a TH⁺ (Isacson et al., 2003). Lo anterior indica que las CTE podrían ser un buen candidato para trasplantes en humanos.

Sin embargo, un problema central es que, como se mencionó arriba, la EP inicia con la degeneración de las neuronas de la SNpc, lo que implica que al hacer trasplantes en el estriado o en SNpc (Goren et al., 2005), ya sea de células TH⁺, CTE u otro tipo celular, no se resuelve la causa de la degeneración, ni se promueve un crecimiento de las neuronas TH⁺ para regenerar la vía negro-estrial o eliminar por completo la sintomatología ya que solamente se han observado mejorías parciales con los implantes en el estriado. Por tanto, la solución actual de la problemática es únicamente funcional, pues sólo se compensa la carencia de dopamina. Si se lograra dirigir el crecimiento axonal de las células implantadas desde la SNpc, por medio de las moléculas quimiotrópicas implicadas en la construcción de este tracto, se resolvería la problemática anatómica y se podría controlar la proyección aberrante de las células transplantadas y la reparación del tejido muerto en la SNpc

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La muerte de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la SNpc es la causa principal de las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Parkinson debido a la disminución o ausencia de dopamina en el estriado. Hasta ahora se sabe que en la rata y el ratón las NDA que se generan en el mesencéfalo embrionario se diferencian hacia dopaminérgicas por el concierto de señales dadas desde E8 hasta E17 por diversos genes como Nurr-1, En-1/En2, Lmx1b y Ptx-3, por mitógenos y morfógenos que generan las señales de diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas como Shh, FGF8 y Wnt-1 (Chinta y Andersen, 2005). También se sabe que el establecimiento de la VNE durante los estadios embrionarios E12 a E15 depende de la correcta expresión de moléculas quimiotrópicas que se dan en el mesencéfalo, el diencefalo y el telencefalo.

El conocimiento con respecto a las moléculas implicadas en la diferenciación hacia NDA como Shh y FG8 ha permitido generar protocolos en los cuales, usando estas moléculas en células troncales embrionarias se obtienen NDA para emplearlas en procedimientos de sustitución celular. Estos procedimientos se han realizado principalmente en ratas y primates no humanos, obteniendo una mejoría en los signos de la EP. Sin embargo, estas mejorías no han implicado la reconstrucción de la VNE. Por tanto, con la información respecto al papel que juegan distintas moléculas quimiotrópicas en la formación embrionaria del tracto se podrían generar protocolos con la finalidad de guiar los axones de las células transplantadas por medio de las señales generadas por esas moléculas. Sin embargo, a la fecha no existen estudios acerca de los factores quimiotrópicos que pueden tener efectos en el crecimiento axonal de las CTE-TH⁺ con el protocolo de 5 etapas. Dado el potencial terapéutico de las CTE, nos planteamos en este trabajo analizar especialmente la presencia de receptores miembros de la familia Robo y la respuesta de la NDA ante la molécula quimiotrópica Slit 1. De obtener semejanzas con la respuesta de NDA embrionarias mesencefálicas a moléculas quimiotrópicas, se permitiría añadir evidencias del carácter dopaminérgico de las TH⁺ generadas in vitro así como aportar información de la respuesta de las NDA embrionarias. En consecuencia se podría plantear el uso de moléculas quimiotrópicas como parte de la terapia de sustitución celular para modular la dirección del crecimiento de los axones de las células transplantadas.

4. HIPOTESIS

Las células troncales embrionarias diferenciadas a neuronas que expresan la hidroxilasa de tirosina responderán de manera repelente o inhibitoria a la molécula quimiotrópica Slit 1, de manera semejante a las neuronas dopaminérgicas embrionarias del área VM y esa respuesta estara correlacionada con la expresión los receptores Robo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de neuronas TH⁺ generadas *in vitro* a partir de células troncales embrionarias ante la proteína quimiotrópica Slit1 y comparar esta respuesta con la obtenida con neuronas dopaminérgicas mesencefálicas embrionarias de los estadios correspondientes a la generación de la vía negro-estrial.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estandarizar el método de cultivo y obtención de células TH⁺ a partir de la metodología de diferenciación en 5 etapas de CTE descrita por Lee et al. (2000), y desarrollar un sistema de cultivo en geles de colágena que permita el crecimiento axonal de las neuronas generadas *in vitro*.
- 2) Analizar mediante inmunotinción la expresión del receptor Robo 1 y 2, en las neuronas TH⁺ obtenidas a partir de CTE y compararla con la expresión en explantes del área VM.
- 3) Analizar la respuesta de los axones de células TH⁺ generadas *in vitro* a un gradiente de Slit 1 producido por células HEK 293, en un sistema de co-cultivo en geles de colágena y compararla con la respuesta de axones dopaminérgicos de explantes del área ventral de mesencéfalo embrionario.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CTE A NEURONAS TH⁺

Se utilizó el proceso de diferenciación en 5 etapas previamente descrito por Lee y colaboradores (2000) (ver detalles en anexo 1) y que a continuación se describe de manera general: la línea celular de CTE de ratón denominada R1, donada por el Dr. Iván Velasco (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), fue expandida mediante el cultivo sobre fibroblastos embrionarios a los que se les agregó Mitomicina C [5µg/µl] (Bristol, Lot. SA08426-3) para impedir su proliferación. Se cultivaron durante 4 días haciendo cambio de medio KOES (ver anexo 2) con ESGRO (Leukemia inhibitory factor, Chemicon, ESG1106) diariamente. Cuando las colonias de R1 se observaron semi-confluentes (antes de tocarse unas con otras), se desprendieron de la caja de cultivo utilizando tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco, 25200-056); una parte se congeló para mantener un banco de células R1 y 2×10^6 células se sembraron sobre cajas de cultivo de 10 cm de diámetro previamente recubiertas con gelatina al 1% (Sigma, G2500).

Etapa I. Expansión de células R1 indiferenciadas. Las Células R1 previamente sembradas en caja recubierta con gelatina (Sigma, G2500), se mantuvieron en medio KOES+ESGRO por 4 días cambiándolo diariamente hasta alcanzar la semi-confluencia.

Etapa II. Formación de cuerpos embrionarios. Las células R1 sembradas sobre cajas recubiertas de gelatina fueron desprendidas de la caja de cultivo con tripsina 0.25% y sembradas en cajas de Petri (sin recubrimiento para cultivo celular), se mantuvieron durante 4 días con KOES+ESGRO. Durante este período, la proliferación de estas células en grupos compactos dieron lugar a la formación cuerpos embrionarios.

Etapa III. Selección de células Positivas a Nestina ó CPN. Los cuerpos embrionarios fueron transferidos a cajas de cultivo celular que permitieran su adhesión. Se mantuvieron durante 7 días adicionado el medio ITS (ver anexo 2) con fibronectina [5µg/ml] (Sigma, F0635) con cambios de medio cada dos días, hasta observar el crecimiento de células de morfología característica de células precursoras neurales.

Etapa IV. Expansión de células Nestina-Positivas. Las CPN fueron desprendidas de las cajas de cultivo celular con Tripsina 0.05% (Gibco, 25300-062) y sembradas en cámaras de cultivo (Labtek Chamber Slide w/cover Nunc), previamente recubiertas con poli-L-Ornitina [15µg/ml](Sigma, P3655) y fibronectina (Sigma, F0635)/laminina [1µg/ml] (Becto Dickinson,

354232). Las células fueron cultivadas por 2 días en N2 (ver anexo 2) con FGFb [10ng/ml] (Preprotech, 1018B) y 4 días en medio N2 con FGFb [10ng/ml] FGF8 [100µg/ml] (Preprotech, 100-25) y Shh [500µg/ml] (Preprotech, 100-45).

Etapa V. Diferenciación a Neuronas Dopaminérgicas. En esta etapa se retiraron los factores de crecimiento y se agregó el medio final de diferenciación que consiste en N2 y ácido ascórbico [200 µM] (Sigma, A4403); los cultivos se mantuvieron en este medio durante 3 a 6 días para obtener células dopaminérgicas o TH⁺.

6.2 OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE CTE DIFERENCIADOS A TH⁺ PARA INMUNOTINCIÓN CONTRA ROBO 1, ROBO 2 Y ROBO N

Cultivos de R1 en etapa III fueron transferidos a una caja de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro previamente recubiertos con Poli-L-Ornitina [15µg/ml], Fibronectina [1µg/ml] y Laminina [1µg/ml]. Algunos cultivos se mantuvieron por 24 hrs en etapa IV y se fijaron en Paraformaldehído (PFA, Sigma, P-6148) al 3.5%. Otros cultivos se llevaron hasta etapa V de diferenciación (6 días en medio N2 y ácido ascórbico) y se fijaron en PFA al 3.5%. En ambos casos, se realizó la inmunotinción para Robo 1, Robo 2 y Robo N como se describe mas adelante. Finalmente, cultivos de etapa V (3 días en N2 y ácido ascórbico) fueron disociados y transferidos a geles de colágena (ver anexo 3), incubados por 48 hrs con medio N2 y ácido ascórbico, fijados en PFA 3.5% e inmunoteñidos.

6.3 CULTIVO DE EXPLANTES DEL AREA VENTRAL DEL MESENCÉFALO EMBRIONARIO

Embriones de rata Wistar de 12, 13, 14 y 15 días de gestación, fueron extraídos y disectados para la obtención del área ventral del mesencéfalo (VM). Para obtener el mesencéfalo, primero se extrajo el neuroepitelio, tanto la parte rostral del romboencéfalo como la parte más rostral del mesencéfalo. Se cortó el tejido en forma de libro abierto, se desechó el romboencéfalo y se cortó 2 mm por encima del Istmo, dejando solamente el fragmento correspondiente al VM. Una vez obtenido éste, se eliminó 1 mm de las áreas laterales para obtener el fragmento que contiene los núcleos de la Sustancia Negra. Se colocaron los explantes en geles de colágena, neutralizando la

colágena con Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) con 1% de penicilina/streptomina (Gibco, 25300-062), Bicarbonato de Sodio (1.547M) (GibcoBRL, 25080-094) y Cloruro de Sodio (10 mM, JT Baker, 3624-05). Los geles se dejaron polimerizar por 20 min a 37°C, 5% CO₂, y se agregó medio Optimix (ver anexo 2) cubriendo el gel por completo. Se cultivaron por 2 días y se fijaron en PFA al 3.5%.

6.4 INMUNOTINCIONES

Las CTE-R1 sembradas en portaobjetos con cámaras de cultivo (Lab-tek Chamber Slide w/cover, Nunc) o sobre cubreobjetos, y los explantes de VM fueron fijados en PFA 3.5% y expuestos a anticuerpos primarios diluidos en solución de buffer salino de fosfatos (PBS, Gibco 70011-044) con Triton X-100 (al 0.1% ó 0.3%)(JT Baker, BK-x198-07) y suero de cabra (al 1%, 5% ó 10%)(Gibco, 16210-072).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-TH monoclonal [1:25] (Chemicon MAB5280), anti-TH monoclonal (Sigma T2928) [1:500]; anti-TH policlonal (Chemicon AB151) hecho en conejo [1:1000]; anti-Robo N policlonal en conejo [1:1250] [obtenido en el laboratorio a partir del péptido de 19 aminoácidos reportado por Sundaresan et al., (2004)] el cual reconoce el dominio extracelular de los receptores Robo 1 y Robo 2, los cuales no presentan diferencias en la secuencia aminocídica; anti-Robo 1 y 2 policlonales en conejo [1: 400] (Donados por Dra. Elke Stein, Molecular, Cellular and Biology Department, Yale University); anti- β -Tubulina-III monoclonal (CYMBUS CBL 412) [1:300] y anti-nestina (Chemicon MAB353) monoclonal [1: 500].

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 488 (Molecular Probes A11029), anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 (Jackson 111-166-003) en concentraciones 1:1000 en PBS.

Para cuantificar el total de células y evaluar la eficiencia de diferenciación, los núcleos se tiñeron con Hoechst (bisBenzimide trihydrochloride, Molecular Probes) 100 μ g/ml en dilución 1:10 en glicerol.

6. 5 AMPLIFICACIÓN DE VECTORES SLIT 1 Y PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

Para la amplificación de los vectores de interés, se transformaron células XLBlue con el vector mSlit1CS2 ó pCABMGFP. Primero se incubaron las células competentes obtenidas de la Unidad de Proteogenómica del INB con el DNA de los plásmidos en hielo por 20 min y posteriormente se les dio un choque térmico de 42°C, se añadieron 450 µl de medio Luria-Bertani (LB) y se incubaron 1 hr a 37°C. Posteriormente, para la expansión de las bacterias, se sembraron en cajas de agar en medio LB con Ampicilina (100µg/µl) (Sigma, A9518) (ambos vectores tienen el gen de resistencia a ampicilina). Se dejaron en incubadora por 24 hrs a 37°C y una vez obtenidas las colonias, se crecieron en medio medio líquido LB/Ampicilina [100 µg/µl] a 37°C en rotación para la extracción del plásmido con el kit Qiagen Plasmid Maxi Kit (protocolo 25, Kit 12263) según el protocolo de los fabricantes.

6. 6 DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El vector de expresión Slit 1 (mSlitCS2myc), que contiene el cDNA de Slit 1 murino (Gene mSL1 de 4.5 kb y plásmido CS2myc 4.3 kb). (Donado por Dr. Rao/ Molecular Biology & Pharmacology, Washington University School of Medicine) fue digerido con EcoR1 (Invitrogen 10 U/µl, Invitrogen 15287-013) y Hind III (Roche 10 U/µl). El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% (Invitrogen, 15510-019), con Bromuro de Etidio (0.5 mg/ml) (Sigma) (ver anexo 4).

6. 7 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK293 E INCLUSIÓN EN GELES DE COLÁGENA

Los vectores de expresión Slit 1 (mSlitCS2myc) bajo el promotor SP6, y de GFP (pCAβmGFP) bajo el promotor de β-Actina de pollo, fueron transfectados en células HEK293 utilizando lípidos catiónicos (FuGENE, Roche 1181509100). El día previo a la transfección se sembraron 1.5×10^5

células en cajas de cultivo de 60 mm con medio DMEM con 10% de Suero fetal bovino. Al día siguiente se transfectó el vector utilizando 200 μ l de la siguiente mezcla de transfección: 96% de DMEM con antibiótico (penicilina/streptomina al 1%), 3% de FuGENE y 4 μ g del vector [1 μ g/ μ l]. La mezcla de transfección se incubó sobre la monocapa de HEK293 por 4 horas a 37°C con 5% de CO₂ agregando 1ml de DMEM con antibiótico. Posteriormente se agregaron 4 ml más de medio para HEK293 y se incubó toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente se despegaron las células con tripsina EDTA 0.05% y se colocaron en un mini gel de colágena (ver anexo 3) con una densidad de 8,000 células por gel. Se dejaron polimerizar por 40 minutos antes de ser incluidos en geles de colágena con CTE diferenciadas a TH⁺ (ver anexo 3). Algunos minigeles fueron fijados en PFA al 3.5% a diferentes tiempos e inmunoteñidos para detectar la expresión de myc y los núcleos fueron teñidos con Hoescht 100 μ g/ml en dilución 1:10 en glicerol.

6.8 CUANTIFICACIÓN, MEDICIONES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.8.1 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS TH⁺ MESENCEFÁLICAS Y CÉLULAS TH⁺ OBTENIDAS IN VITRO DE CTE.

Explantos de mesencéfalo ventral embrionario y CTE sometidas al proceso de diferenciación de 5 etapas de Lee et al., (2000), previamente inmunoteñidos contra TH y los receptores para Slit, fueron observados en microscopia confocal (Nikon Eclipse E600, PCM 2000). Diversos campos fueron fotografiados en las diferentes longitudes de onda para detección de los fluoróforos Alexa 488 y Cy3 acoplados a los anticuerpos secundarios utilizados contra ratón y conejo, respectivamente. Las imágenes se sobrepusieron en Photoshop 7.0 y se cuantificaron mediante una rejilla de 9 campos las células TH⁺/Robo⁺, así como células TH⁺/Robo. Se determinó el porcentaje de expresión de Robo 1, 2 y N en el total de células TH⁺ para cada campo y se realizó el análisis estadístico aplicando la prueba ANOVA para la comparación de las medias estadísticas, así como la prueba Post Hoc de Tukey para verificar la significancia entre grupos usando un 95% de confianza ($P \leq 0.05$) con el programa SPSS (Statistics Program System Software).

6.8.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁNGULOS EN CÉLULAS TH⁺ OBTENIDAS IN VITRO

CTE sometidas al proceso de diferenciación de 5 etapas y cultivadas en geles de colágena fueron inmunoteñidos contra TH y los receptores para Slit y fueron observadas por microscopía confocal (Nikon Eclipse E600, PCM 2000). Diversos campos fueron fotografiados indicando en cada caso la ubicación del agregado de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para mSlit1 o sin transfectar. Se determinó el ángulo de crecimiento de cada axón con respecto al agregado de células HEK293 (el crecimiento dirigido al agregado se consideró como ángulo 0°) y se determinó la frecuencia de ángulos de crecimiento para los rangos de 0°-60°, 61°-120° y 121°-180°. De esta manera, se consideró el crecimiento en el rango de 0° a 60° como muestra de atracción, en el rango de 61° a 120° como indistinto y en el de 121° a 180° como repulsión (ver Fig. 8). Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante la prueba estadística ANOVA multifactorial para comparar los tres grupos y verificar si había alguna tendencia de atracción o repulsión de los axones.

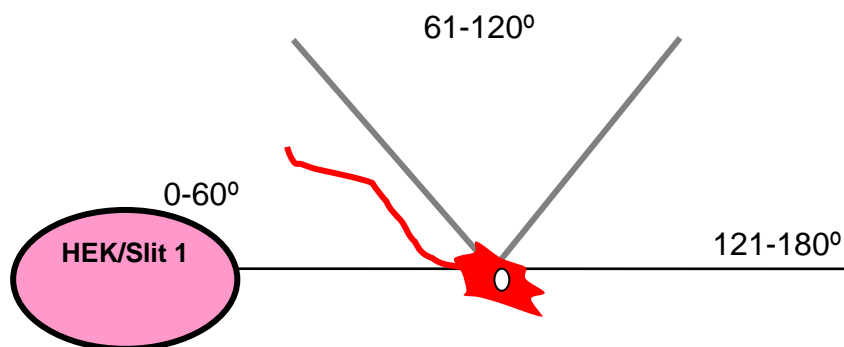


Figura 8. Medición de ángulos tomando como eje de referencia 0 el agregado de células HEK293. Se muestra una neurona y uno de sus axones creciendo en una dirección en el rango de 0 a 60° con respecto al agregado de células HEK293.

6.8.3 MEDICIÓN DE LONGITUD DE AXONES

Explantos de mesencéfalo ventral embrionario y células TH⁺ obtenidas in vitro a partir de CTE inmunoteñidas contra TH y los receptores para Slit, fueron observadas por microscopía confocal y diversos campos fueron fotografiados. Utilizando el programa de computación Image Proplus 4.0, la longitud de los axones fue medida en las imágenes obtenidas tomando desde el inicio del soma hasta la punta del axón. Se realizó la prueba T de student, teniendo como variable dependiente la exposición a la molécula quimiotrópica. En los axones fasciculados se midió la longitud del fascículo completo y se tomó como uno solo.

7. RESULTADOS

7.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES A TH⁺ POR EL PROTOCOLO DE 5 PASOS

Para la obtención de células TH⁺ a partir de células troncales embrionarias se utilizó la línea celular de CTE R1, la cual se diferenció según la metodología de 5 etapas descrita previamente por Lee y colaboradores (2000).

Los cultivos de CTE-R1 fueron sembrados para expandir la población sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios previamente tratados con mitomicina C la cual inhibe su proliferación. Se observó la presencia de colonias bien definidas indicando morfológicamente el estado indiferenciado de las células (ver Fig. 9a). Para iniciar el proceso de diferenciación o etapa I, las células R1 se resembraron en cajas con gelatina, después de disgregarlas. En esta etapa se observó la formación de colonias menos compactas y con prolongaciones celulares (ver Fig. 9b). En la etapa II las colonias previamente crecidas en caja recubierta con gelatina, se resembraron en cajas de Petri sin recubrimiento para cultivo celular con el fin de favorecer la formación de cuerpos embrionarios (CE); se observó la formación de CE característicos de esta etapa (Fig. 9c). En la etapa III se sembraron los CE sobre cajas de cultivo celular, para permitir la adhesión. Se observaron células con morfología triangular características de CPN que proliferaban (Fig. 9d) y migraban a partir de los CE adheridos (Fig. 9e). Al final de esta etapa se observaron células con procesos semejantes a neuritas (Fig. 9f, flecha). En la etapa IV se desprendieron de la caja de cultivo y se resembraron los cultivos de CPN en cajas recubiertas con fibronectina, laminina y poli-L-ornitina (ver Material y Métodos), observando la adhesión de algunas células a la caja de cultivo celular (Fig. 9g). Finalmente, en la etapa V de diferenciación se retiraron los factores de crecimiento, se observó el crecimiento de neuritas provenientes de las colonias adheridas (Fig. 9h) y se pudo apreciar la formación de fascículos de axones provenientes de las células agrupadas en colonias después de 6 días (Fig. 9i). Con este seguimiento se verificó que la morfología de las células durante las diferentes etapas del proceso de diferenciación correspondiera a lo antes reportado (Lee et al., 2000).

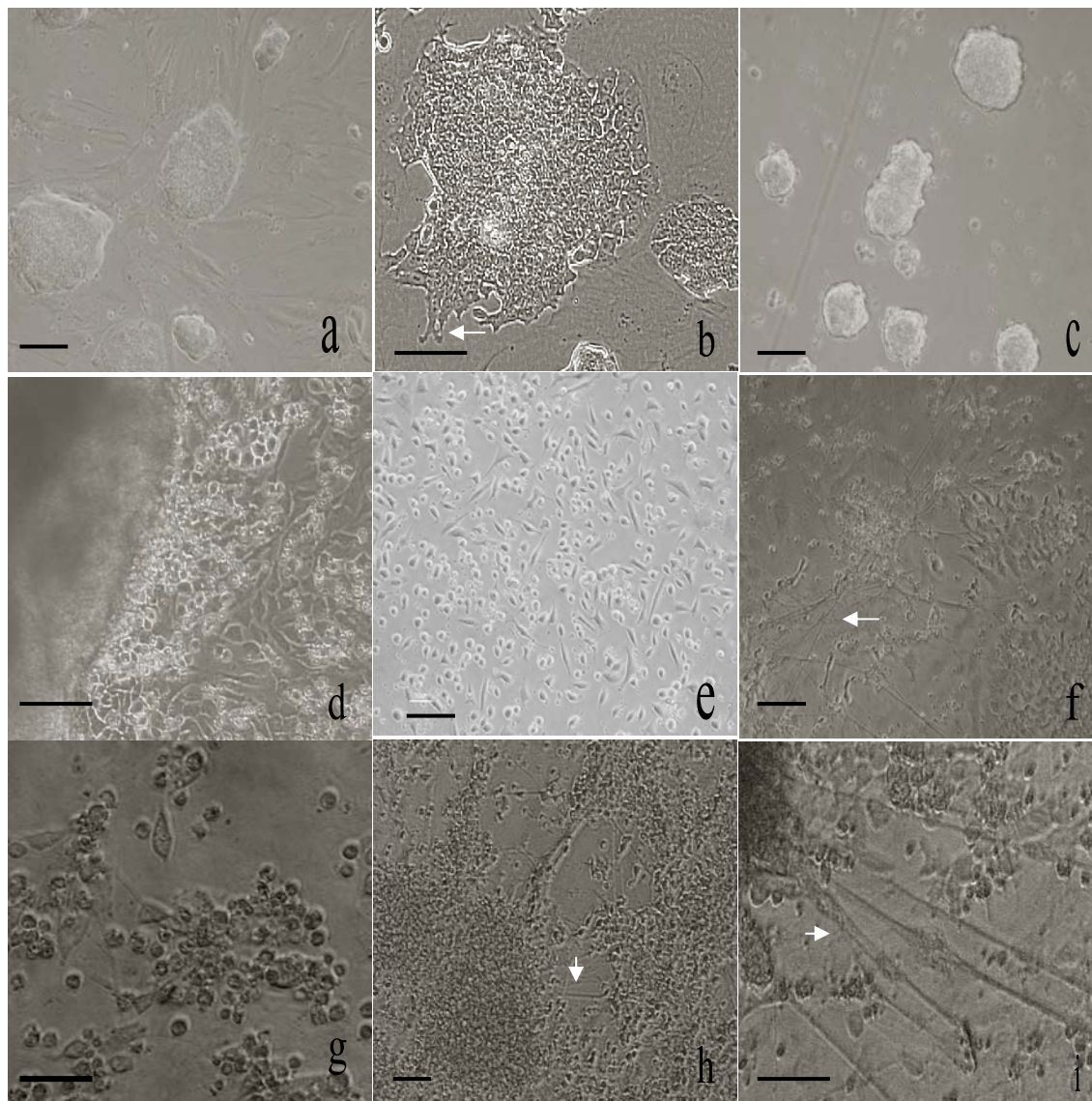


Fig. 9. Formación de Neuronas a partir de células troncales embrionarias. Células troncales embrionarias R1 fueron cultivadas y diferenciadas a neuronas dopaminérgicas según la metodología de 5 pasos, con la formación de cuerpos embrionarios. Mediante microscopía de contraste de fases se realizó el seguimiento de la morfología celular en cada una de las etapas del proceso. a) Expansión de CTE-R1 sobre fibroblastos, se observan colonias compactas con bordes definidos, morfología típica de células no diferenciadas. b) Etapa I, día 4: CTE-R1 sobre gelatina, se observan colonias menos compactas con algunos procesos celulares emergiendo de estas (flecha); c) Etapa II, día 4: CTE-R1 fueron transferidas en cajas de Petri para permitir la formación de cuerpos embrionarios; d) Etapa III día 2: los CE fueron trasferidos a cajas de cultivo celular para permitir la adhesión y migración de células; e) Etapa III, día 4: Migración de células precursoras neurales; f) Etapa III, día 7: se observan células con extensiones de neuritas (flechas); g) Etapa IV: células precursoras neurales después de 2 días de cultivo con los factores FGFb, FGF8 y Shh. h) Etapa V día 6: se observa una colonia de la cual emergen numerosas neuritas (flechas), i) A mayor aumento, se observa la formación de fascículos proveniente de colonias. Barra de calibración 50µm.

Con el fin de verificar la proporción de CPN obtenidas bajo nuestras condiciones de cultivo, las células al término de la etapa III fueron desprendidas de la caja de cultivo y sembradas en portaobjetos con cámaras de cultivo previamente recubiertos poli-L-ornitina, laminina y fibronectina, se cultivaron por 1 día en medio de cultivo N2 y se fijaron e inmunotñieron con anticuerpo Anti-nestina que es un filamento intermedio característico de células precursoras neurales tiñendo los núcleos simultáneamente con Hoechst. Se observaron colonias de células positivas a nestina o CPN que correspondieron aproximadamente al 90% de las células totales (Fig. 10 a-c).

Por otro lado, para verificar la proporción de neuronas TH⁺ obtenidas, se cultivaron CTE-R1 y se llevaron hasta etapa V (6 días en medio final de diferenciación), se fijaron e inmunotñieron contra TH; también se inmunotñieron contra β -Tubulina, un filamento intermedio característico de neuronas. Se verificó el porcentaje de neuronas TH⁺, obteniéndose 37% del total de células diferenciadas (Fig. 10 d-f).

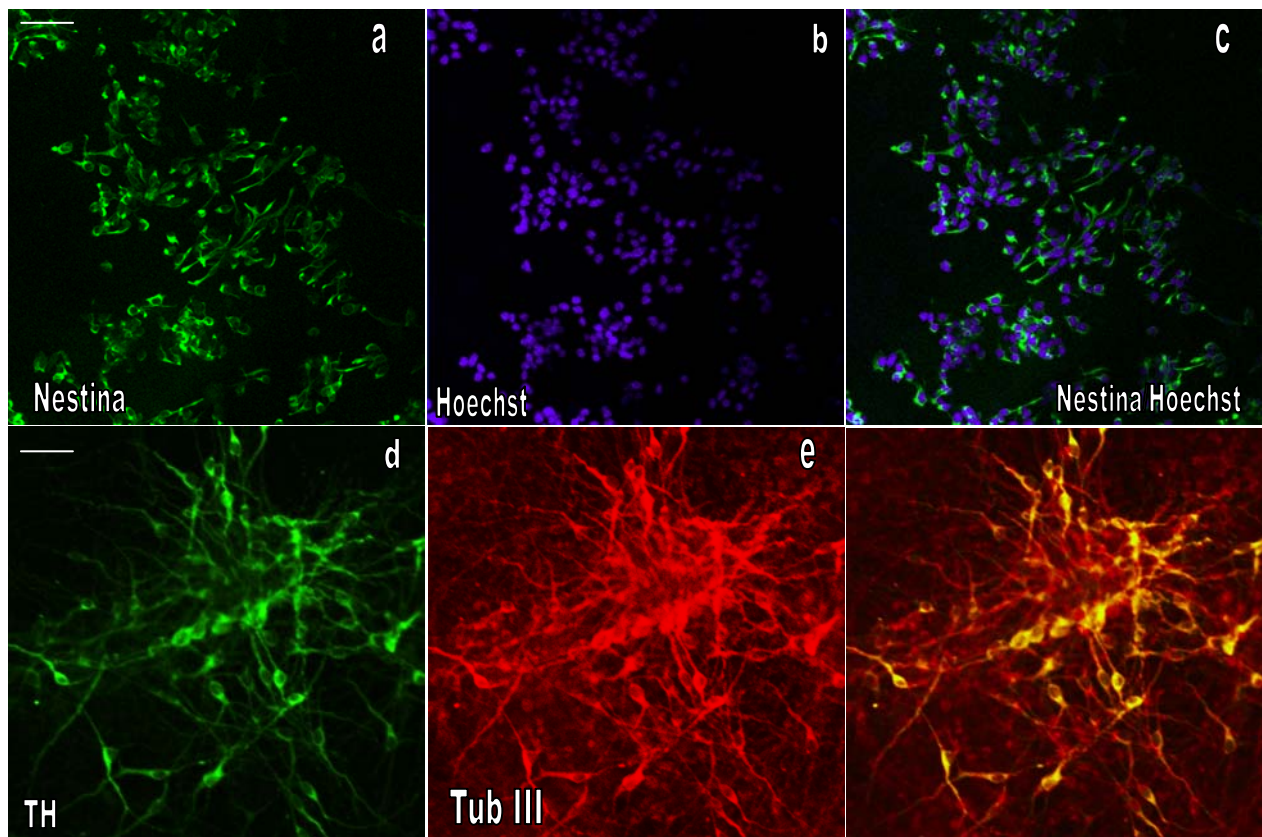


Fig. 10. Obtención de CPN y neuronas TH⁺ por medio del proceso de diferenciación de 5 etapas. CTE-R1 fueron cultivadas hasta etapa III, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo anti-Nestina y los núcleos identificados con Hoechst (b). Se observó aproximadamente un 90% de eficiencia de diferenciación hacia precursoras neurales (a). (d-f) CTE-R1 fueron llevadas hasta etapa V, después de 6 días en medio de diferenciación final fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos anti-TH (d) y anti- β -TubulinaIII (e) Se observan numerosas neuronas de las cuales aproximadamente un 37% son TH⁺ (f). Barra de calibración 50 μ m

7.2 BAJO PORCENTAJE DE EXPRESION DE RECEPTORES A SLIT EN CÉLULAS TH⁺ OBTENIDAS IN VITRO A PARTIR DE CTE Y CÉLULAS TH⁺ DE EXPLANTES DE MESENCÉFALO EMBRIONARIO

Recientemente se reportó que CTE diferenciadas a TH⁺ por el método de co-cultivo con células estromales PA6 que favorecen la diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas, expresan los receptores a Slit: Robo 1, 2 y 3 (Lin e Isacson, 2006). Este método de diferenciación se caracteriza por utilizar medios de cultivo libres de suero, ausencia de formación de cuerpos embrionarios y de factores de crecimiento, por lo que es sustancialmente diferente del proceso de diferenciación en cinco etapas. Cabe señalar que en ambos casos la eficiencia de formación de células TH⁺ es similar (aproximadamente 30%) y en ambos casos las células obtenidas parecen tener un potencial terapéutico importante ya que se ha reportado para ambos procesos un efecto de recuperación en modelos animales de la EP (Kim et al., 2002; Barberi, 2006). Sin embargo, para el caso del método de diferenciación de neuronas TH⁺ en cinco etapas no existen hasta la fecha estudios que caractericen la presencia de receptores a moléculas quimiotrópicas y su respuesta a éstas. Por ello en este trabajo primeramente se caracterizó la expresión de los receptores a Slit 1, Robo 1, 2 con anticuerpos específicos y con anticuerpos (RoboN) que detectan las 3 isoformas del receptor a Slit incluido Robo 3, para posteriormente evaluar su respuesta ante la molécula quimiotrópica Slit 1. Cultivos de CTE fueron llevados hasta la etapa V de diferenciación, fijados al día 6 e inmunoteñidos contra los 3 receptores utilizando los anticuerpos específicos para Robo 1 y 2 y el anticuerpo Robo N así como anticuerpos contra TH. Se observó en microscopía confocal y se cuantificó la expresión de los receptores en las células TH⁺.

Se observó la expresión de los receptores Robo 1, 2 y N en un gran número de células incluidas las TH⁺, aunque cabe señalar que no todas las células TH fueron positivas para los receptores, el 24.08% del total de las células TH⁺ por campo fueron positivas para Robo 1, el 33.45% para Robo 2 y 32.37% para Robo N (ver Fig. 11).

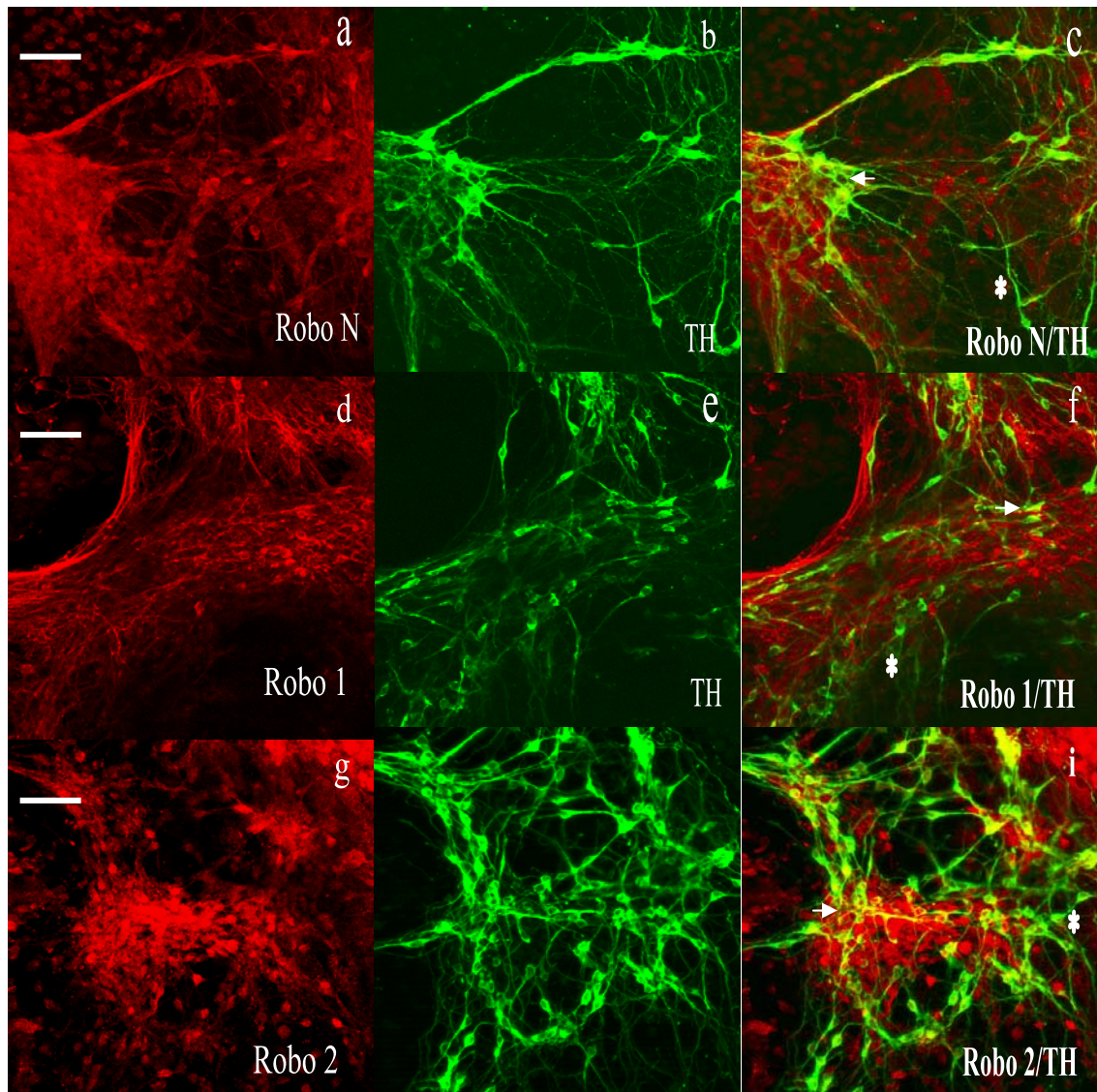


Fig 11. Algunas células TH⁺ obtenidas in vitro por el proceso de 5 etapas expresan los receptores a Slit. CTE-R1 diferenciadas in vitro, después de 6 días en medio final de diferenciación fueron fijadas e inmunoteñidas con los anticuerpos anti-TH monoclonal en ratón (b,e,h), anti- Robo N, Robo 1 y Robo 2 policlonal en conejo (a,d,g). Se observa co-localización en algunas células TH⁺ con Robo N, 1 y 2 (flechas) (c,f,i) Así mismo se observan células TH⁺ que no expresan el receptor a Slit (*). Microscopía confocal, barra de calibración: 50µm.

Previamente, Lin e Isacson (2006) reportaron que células dopaminérgicas de explantes de mesencéfalo de embriones de rata en E14 expresan los receptores Robo 1 y 2 y responden a la proteína Slit 1 con un efecto repulsivo y de inhibición del crecimiento de las neuritas. Con el fin de comparar si la expresión de los receptores Robo en células TH⁺ diferenciadas de CTE, es

semejante a la expresión de Robo durante alguno de los estadios embrionarios en los que las neuronas dopaminérgicas proyectan hacia el estriado, se obtuvieron los núcleos de la SNpc para su cultivo en geles de colágena. Se eligieron los estadios desde E12, pues es cuando la proyección mesencefálica comienza, hasta el E15 cuando las proyecciones negroles llegan a su blanco en el estriado. Los explantes se incluyeron en geles de colágena y se cultivaron por 2 días para permitir el crecimiento de neuritas. Se fijaron y se realizó la doble inmunotinción contra TH, Robo 1 y Robo 2. Se observó que también en los explantes del área VM embrionario no todas las TH⁺ expresaban los receptores para Slit, similar a lo observado en las células TH⁺ obtenidas in vitro a partir de CTE (Fig. 12).

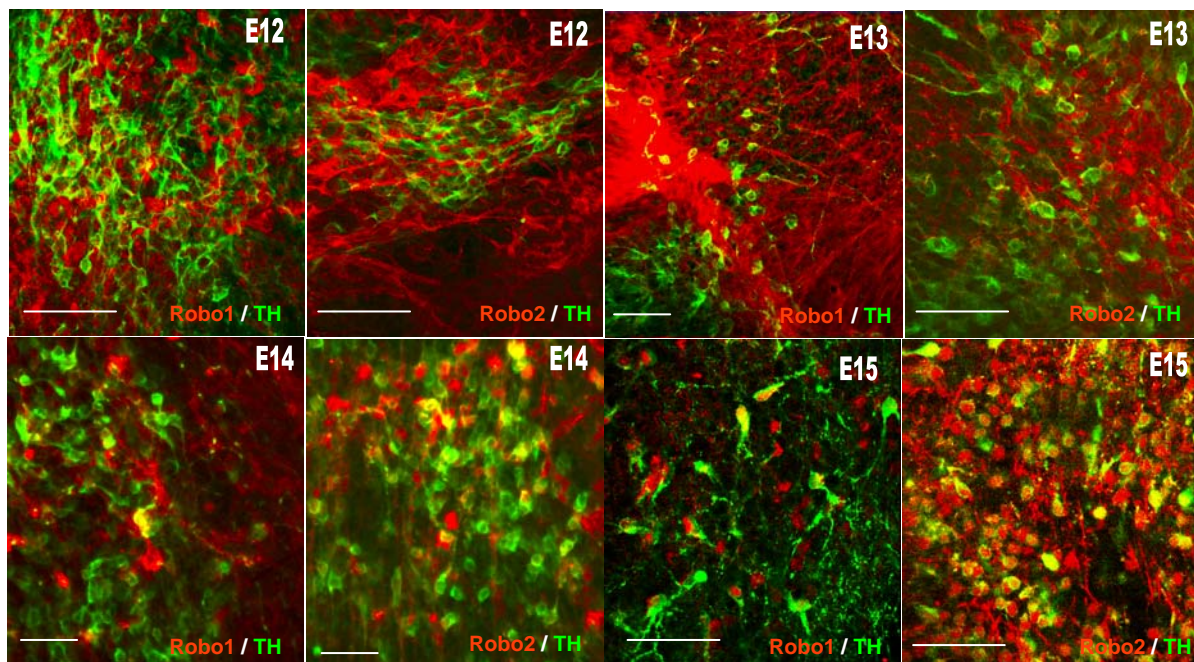


Fig. 12. Baja expresión de Robo 1 y 2 en células TH⁺ de explantes del área VM embrionario. Explantes de VM embrionario en E12, 13, 14 y 15, fueron cultivados en geles de colágena, fijados e inmunoteñidos con anti-TH y anti-Robo 1 ó 2. Se observa expresión tanto de Robo 1 y 2 en las células TH⁺ de los explantes. La co-localización de Robo1 en células TH⁺ se mantiene en baja proporción en explantes de los diferentes estadios. Robo 2 se encuentra co-localizando también en una baja proporción de células TH⁺ de explantes de E12, 13 y 14. En E15 la expresión de Robo 2 aumenta significativamente. Microscopía confocal: barra de calibración 50µm.

Para analizar con mayor precisión el porcentaje de expresión de los receptores Robo en las células TH⁺ obtenidas in vitro y las procedentes de explantes de embrión, se cuantificaron las células TH⁺/Robo⁺ en cada caso. Se observaron variaciones de expresión durante los diferentes estadios embrionarios. Dichas variaciones solo fueron significativas para el E15, donde la expresión de Robo 2 aumenta considerablemente. Para los demás estadios observamos que no

hay diferencias significativas con respecto a la expresión de los receptores entre las CTE-TH con los diferentes estadios 12 a 14.

Posteriormente se aplicaron las pruebas estadísticas correspondiente (ver métodos) para verificar si existía alguna diferencia significativa en la expresión del receptor en los diferentes estadios y en comparación a las células TH⁺ obtenidas *in vitro*. Como se observa en la Figura 13, las células TH⁺ obtenidas *in vitro* a partir de CTE, no presentan diferencias significativas en comparación con los estadios E12 a E14 en cuanto a la expresión de los receptores Robo 1 y 2, lo que implicaría que su expresión es similar. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la expresión de Robo 2 en el E15, ya que la expresión del receptor se incrementa drásticamente en las células TH⁺ de VM hasta un 98.5%.

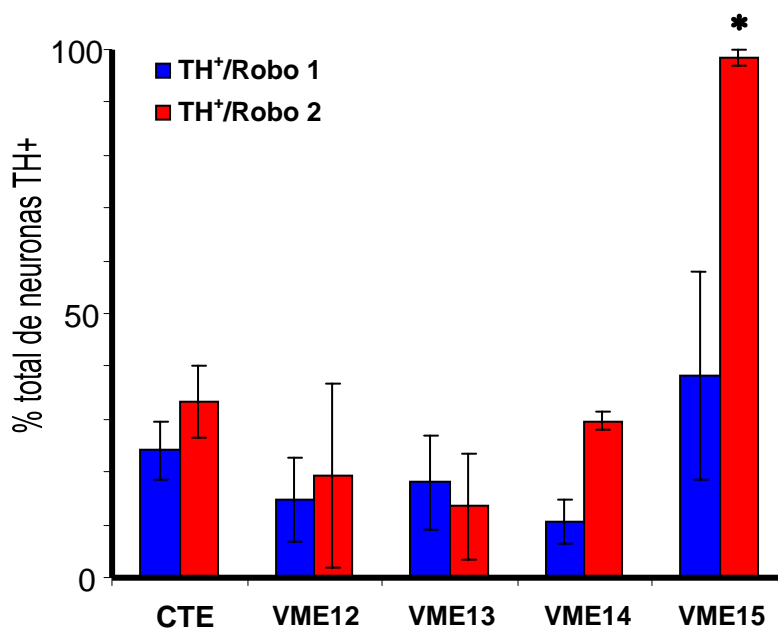


Fig. 13. Comparación del porcentaje de expresión de los receptores Robo 1 y 2 en neuronas TH⁺ de área VM embrionario y de células TH⁺ obtenidas *in vitro* a partir de CTE. Explantes de mesencéfalo incluidos en geles de colágena y células TH⁺ diferenciadas *in vitro* a partir de CTE fueron inmunoteñidos con anticuerpos anti-TH, Robo 1 y 2. Se realizó un muestreo por medio de microscopia confocal de ambas preparaciones y se contaron los somas que co-localizaban: TH⁺/Robo 1⁺ y TH⁺/Robo 2⁺. Se encontró que las células TH⁺ obtenidas *in vitro* expresan en proporción similar los receptores a Slit que los estadios E12, E13 y E14. Se encontraron diferencias significativas en E15 sólo para Robo 2 en comparación con todos los otros cultivos. N=4-6 explantes de VM por estadio. N= 3 campos por cubreobjetos, 6 cubres por receptor.

7.3 LOS AXONES ROBO+ Y TH- DEL AREA VENTRAL DEL MESENCÉFALO EXPRESAN UNA RESPUESTA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO ANTE SLIT 1

Una vez identificada la presencia de los receptores a Slit en las células TH⁺ en explantes del área VM embrionario se analizó la respuesta quimiotrópica a esta proteína. Para este propósito se utilizaron células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para Slit 1 (ver métodos). Primeramente se estandarizó la técnica de transfección y se verificó la expresión del vector a diferentes tiempos (Fig 14) observándose la mayor expresión de la proteína myc a las 48 hrs post-transfección. (Fig 14-e) realizando dicho experimento 2 veces.

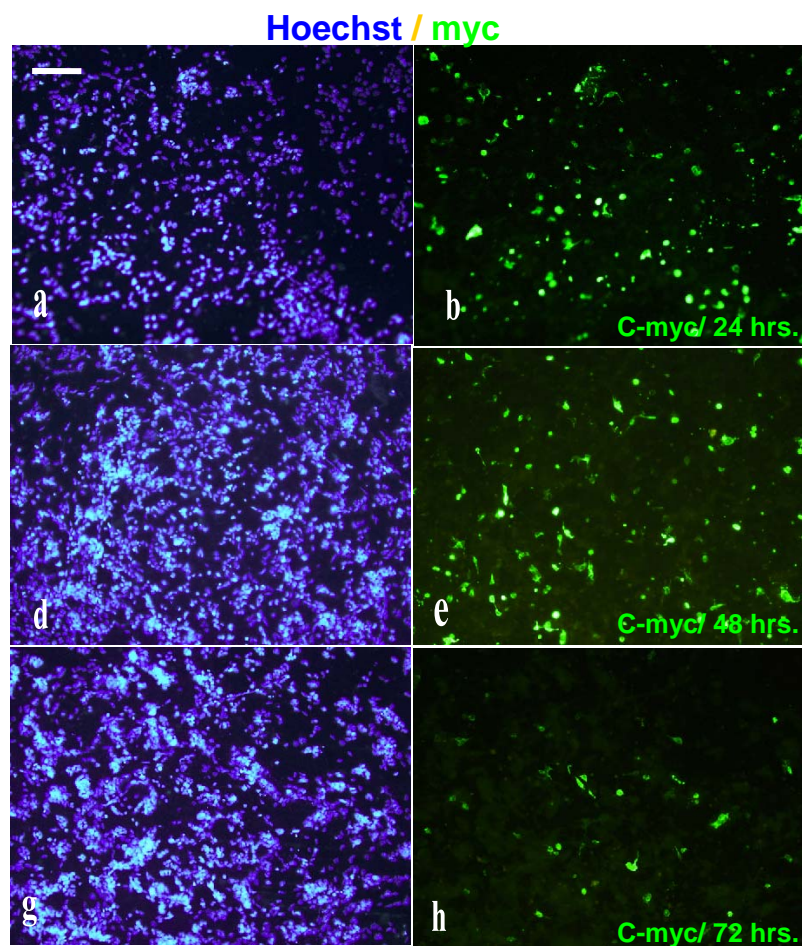


Fig. 14. Transfección del vector de expresión de Slit 1 en células HEK293. Células HEK293 fueron transfectadas con el vector mSlitCS2 para expresar la proteína Slit 1. Las células fueron tripsinizadas, incluidas en geles de colágena y fijadas 24hrs, 48 hrs y 72hrs. Para identificar la expresión de Slit 1 se inmunotizó con un anticuerpo anti c-myc. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst para visualizar el número total de células usadas en el proceso de transfección. Se obtuvo una eficiencia de transfección de aproximadamente el 32.5% entre las 24 y 48 hrs; sin embargo se observa una disminución de expresión a las 72hrs. Microscopia de fluorescencia. Barra de calibración: 50 micras.

Para verificar el efecto de la proteína Slit 1 transfectada, explantes del área VM de embriones de E14, que previamente se había reportado que eran repelidos e inhibidos el crecimiento por Slit 1 (Lin e Isacson, 2006), explantes del área VM fueron co-cultivados con los agregados de HEK293 tranfectados con Slit 1 o sin tranfectar (controles) por 60 hrs. Los explantes fueron fijados e inmunoteñidos contra TH, Robo 1, 2 y N observándose que el crecimiento de axones era menor en explantes expuestos a los agregados de células HEK293 expresando Slit 1, que en explantes controles (Fig. 15).

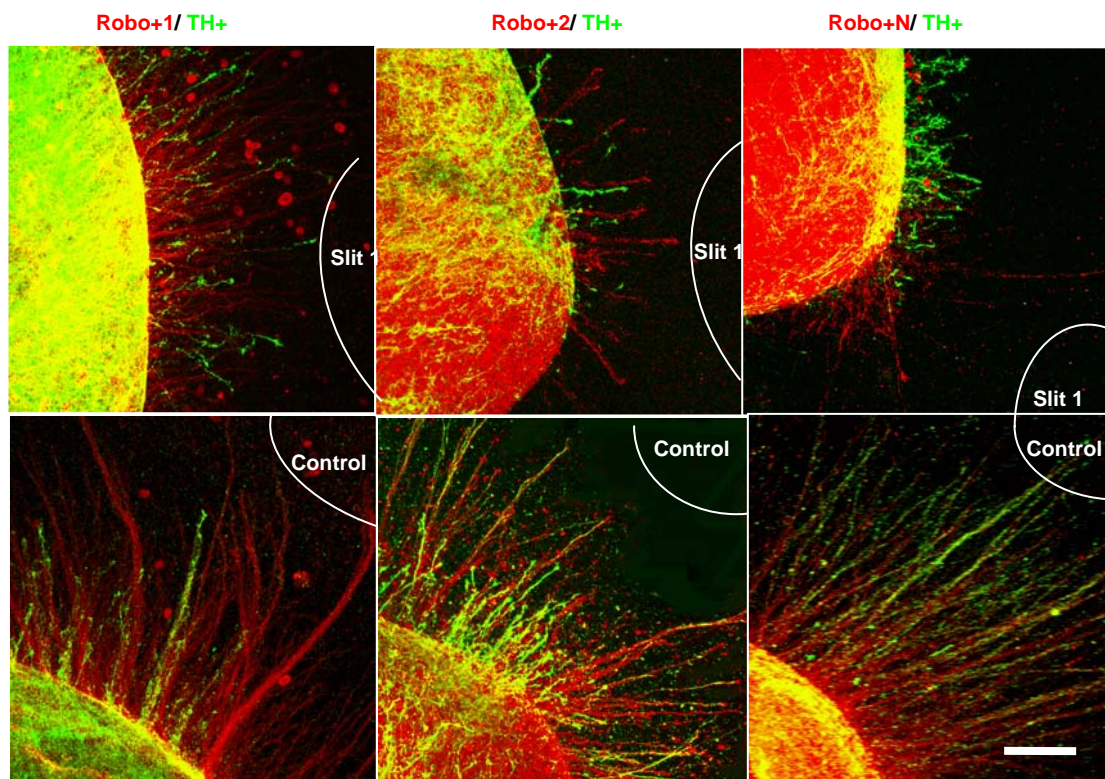


Fig. 15. Efecto de Slit 1 en explantes de E14 de VM embrionario. Explantes del mesencéfalo ventral de embriones de rata de E14 fueron expuestos a células HEK293 tranfectadas con el vector de expresión de Slit 1 ó sin tranfectar (control). Se incubaron por 60hrs, se fijaron y se inmunotiñeron para TH y Robo 1, 2 y N. En las micrografías obtenidas por microscopía confocal se observa un menor crecimiento de las neuritas expuestas a Slit 1 en comparación con los explantes control, así como la presencia de numerosas neuritas Robo⁺ de las cuales sólo algunas son TH⁺. Barra de calibración, 100 μ .

Una vez tomadas las micrografías de los explantes de E14 se midió la distancia de los axones Robo⁺ por medio del programa Image proplus 4.0 (ver métodos). Se realizó la prueba T de Student, donde se comparó los axones Robo⁺ expuestos a Slit1 con aquellos axones no

expuestos a la molécula (agregados de HEK293 sin transfectar). Se encontró, con un 95% de confianza, que los axones Robo 1 y 2 positivos expuestos a Slit 1 tenían un menor crecimiento en comparación con los controles (ver Fig. 16) y con un 99% de confianza que los axones inmunoteñidos con el anticuerpo Robo N que detecta los 3 receptores, habían sido inhibidos por Slit 1.

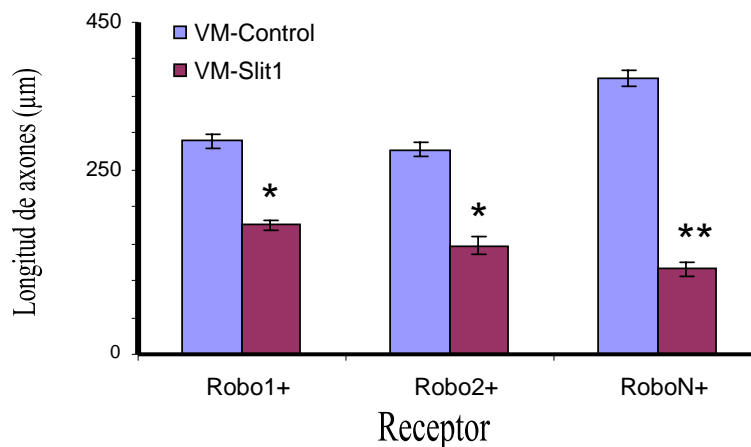


Fig. 16. Inhibición del crecimiento axonal de neuronas Robo⁺ de explantes de VM de E14. Explantes de VM fueron expuestos a agregados de células HEK293 transfectadas con Slit o sin transfectar, e inmunoteñidos contra Robo 1, 2 y N. Se observa que los axones de los explantes positivos a los diferentes receptores para Slit, en co-cultivo con agregados de células HEK293 sin transfectar, tiene una longitud significativamente mayor que los expuestos a células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para Slit 1. * P<0.05 ** P<0.001. N=145 axones Robo 1/Slit1. N=30 axones Robo 2/Slit1. N=68 axones Robo N/Slit1. N=178 axones Robo1/control. N= 115 axones Robo2/control. N= RoboN/control, 182 axones. 4 explantes por cada condición.

Por otro lado observamos que todos los axones inmunoteñidos presentaban una inhibición del crecimiento al ser expuestos a Slit 1. Sin embargo, resultados previos de la expresión de receptores en las neuronas del mesencéfalo ventral nos indicaban que no todas las neuronas TH⁺ expresaban el receptor a Slit. Por lo anterior, se analizó específicamente la longitud de los axones TH⁺/Robo⁻ para identificar si la presencia del receptor era indispensable para la respuesta a Slit1. Interesantemente, observamos que los axones dopaminérgicos que no poseían el receptor también presentaron una inhibición del crecimiento axonal (ver Fig. 17) siendo significativa la diferencia con respecto a los explantes control.

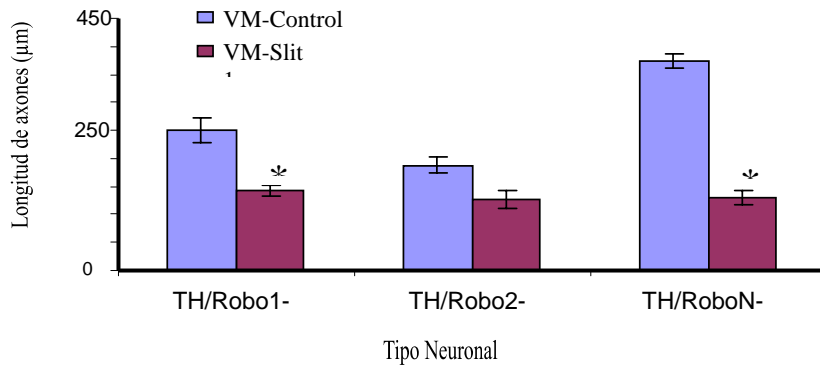


Fig. 17. Inhibición del crecimiento axonal de neuronas TH⁺ de explantes de VM de E14 que no expresan los receptores a Slit. Explantes de VM fueron expuestos a agregados de células HEK293 transfectadas con Slit o sin transfectar y fueron inmunoteñidos contra TH y Robo 1, 2 y N. Se observó una disminución significativa de los axones TH⁺ que carecen de los receptores para Slit en comparación con los expuestos a agregados control. P<0.05. N= 42 axones TH/Robo1-/Slit1. N=13 axones TH/Robo2-/Slit1. N=15 axones TH/RoboN-/Slit. N= 34 axones TH/Robo1-/control. N=54 axones TH/Robo2-/control. N=45 axones TH/RoboN-/control.

En cuanto al análisis de la respuesta de atracción o repulsión, no se logró observar un patrón de cambio de dirección en los axones, debido principalmente a que el crecimiento axonal fue difuso y hacia todas direcciones con respecto a el agregado de células HEK293; no se observó la presencia de fascículos que permitieran un análisis claro de la dirección de crecimiento, tanto en explantes tratados (Fig. 18a) como control (Fig. 18b).

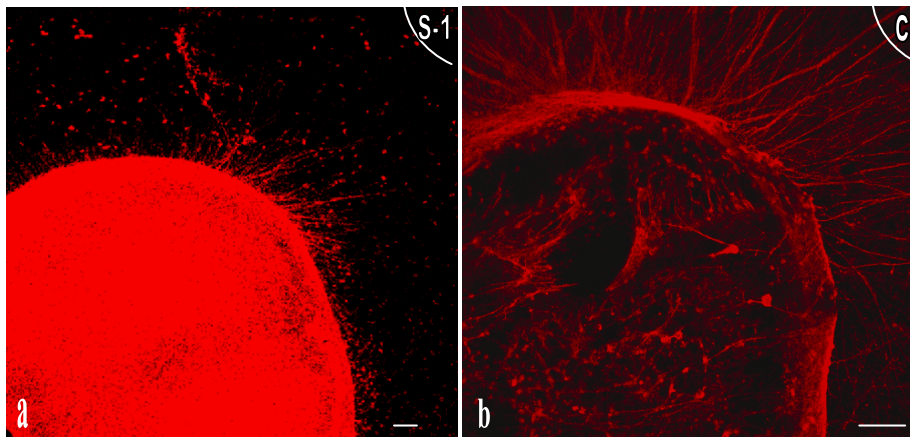


Fig. 18. Crecimiento axonal de explantes del área VM de embriones de 14 días expuestos a Slit 1 y control. Explantes de VM de rata fueron incluidos en geles de colágena con agregados de células HEK293 expresando Slit 1 (a) ó sin transfectar (b). de axones ni fasciculación después de 60hrs de cultivo. Barra de calibración 100 micras.

7.4 LAS NEURONAS TH⁺/ROBO⁺ OBTENIDAS IN VITRO A PARTIR DE CTE NO RESPONDEN A SLIT 1, SOLO NEURONAS ROBO⁺ RESPONDEN CON INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO AXONAL

Una vez verificada la respuesta de neuronas dopaminérgicas embrionarias ante la molécula Slit 1 que era expresada por las células HEK293 transfectadas con el vector de expresión mSlit 1 CS2, se realizó un sistema de co-cultivo similar con CTE. CTE-R1 en etapa V de diferenciación en día 3 en medio final de diferenciación (N2+ácido ascórbico) fueron desprendidas de la caja de cultivo, disociadas e incluidas en geles de colágena, junto con agregados de células HEK293 expresando Slit1 y agregados de HEK293 sin transfectar (controles). Estos cultivos fueron fijados después de 48 hrs de incubación e inmunoteñidos contra TH y los receptores a Slit (ver Fig. 19). Se obtuvieron micrografías en microscopia confocal y se midió la longitud de los axones TH⁺/Robo⁺ para evaluar un efecto en el crecimiento y el ángulo de los axones con respecto al agregado de células HEK293 (ver métodos) para evaluar un efecto de atracción o repulsión.

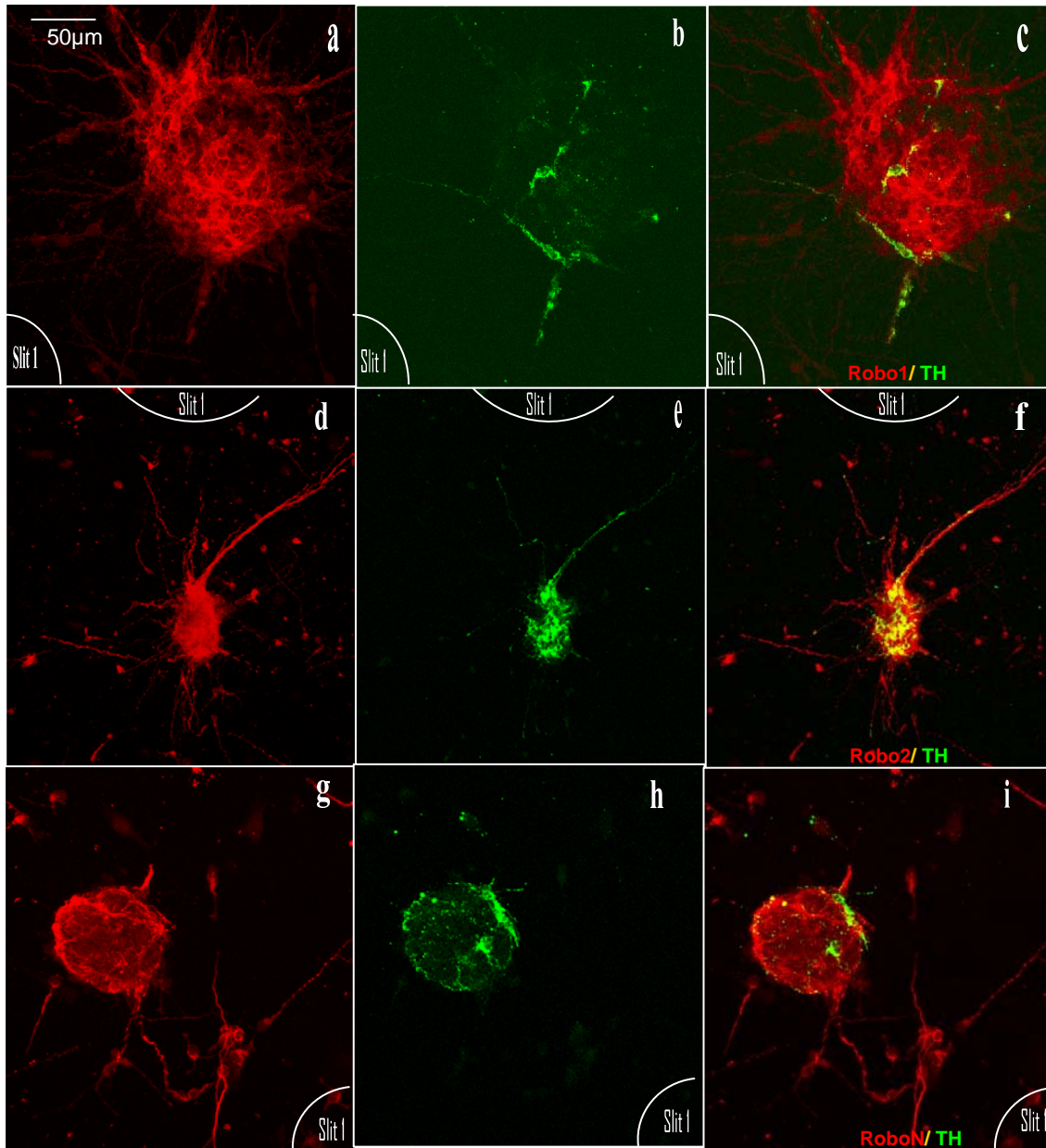


Fig. 19. CTE diferenciadas in vitro a células TH⁺ en co-cultivo con células HEK293 transfectadas con Slit 1. CTE fueron cultivadas hasta etapa V día 3 en medio final de diferenciación, fueron despegadas de la caja de cultivo, disgregadas e incluidas en geles de colágena y co-cultivadas con agregados de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para Slit 1 . Se dejaron en cultivo 48hrs, fueron fijadas e inmunoteñidas contra TH y contra Robo 1, Robo 2 y Robo N. Se observa el crecimiento de células TH⁺/Robo⁺ en agregados de células TH⁻/Robo⁺. (Barra de calibración 50µm).

Una vez obtenidas las mediciones de los ángulos de las células TH⁺/Robo⁺ y del tamaño de los axones de estas mismas células se realizó el análisis estadístico correspondiente (ver métodos). No se encontró ninguna diferencia significativa entre las células TH⁺/Robo⁺ expuestas a Slit 1

con respecto a los controles, ni en inhibición o promoción del crecimiento de los axones (Fig. 20a), ni en la repulsión o atracción de éstos hacia la fuente de expresión de Slit 1 (Fig. 20b), Esto sugiere que las células TH⁺/Robo⁺ no están respondiendo a Slit 1 a semejanza de lo observado para las neuronas dopaminérgicas del área VM embrionario.

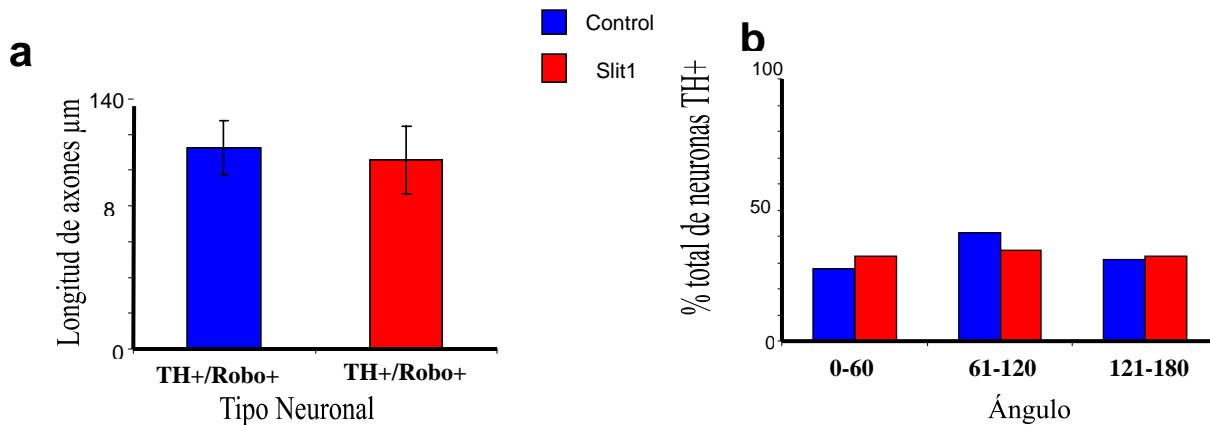


Fig. 20. Respuesta de células TH⁺/Robo⁺ obtenidas in Vitro a partir de CTE expuestas a la molécula quimiotrópica Slit 1. A) Comparación de longitud de axones de células TH⁺ expuestas a agregados celulares de HEK293 transfectadas con el vector para Slit 1 con respecto a agregados sin tranfectar; aunque se observa una longitud menor para los axones TH⁺ expuestos a Slit, la diferencia con los controles no es significativa ($P > 0.05$); B) Orientación de axones con respecto al agregado de células HEK293 expresando Slit 1, no se observó una tendencia de orientación axonal con respecto a la fuente de expresión de Slit 1 ($P > 0.05$). N= 46 axones TH/Robo+/Slit 1. N= 29 axones TH/Robo+/control

Considerando que durante la diferenciación de las células troncales se generan diversos tipos neuronales además de TH⁺ los cuales expresaban los receptores a Slit, se llevó a cabo la medición de la longitud y el ángulo de axones de células Robo⁺, es decir la dirección que estos axones tenían con respecto a los agregados celulares que expresaban Slit 1. Como se observa en la Figura 21, células troncales sometidas al proceso de diferenciación de 5 pasos, fueron disgregadas en etapa 5 3 días de medi final de diferenciación (ver metodos) e incluidas en geles de colágena. Después de 48 hrs. de cultivo, fueron inmuno-teñidas con los anticuerpos que identifican a los receptores de Slit 1. Se tomaron fotografías por medio de microscopía confocal y posteriormente se realizaron las mediciones correspondientes.

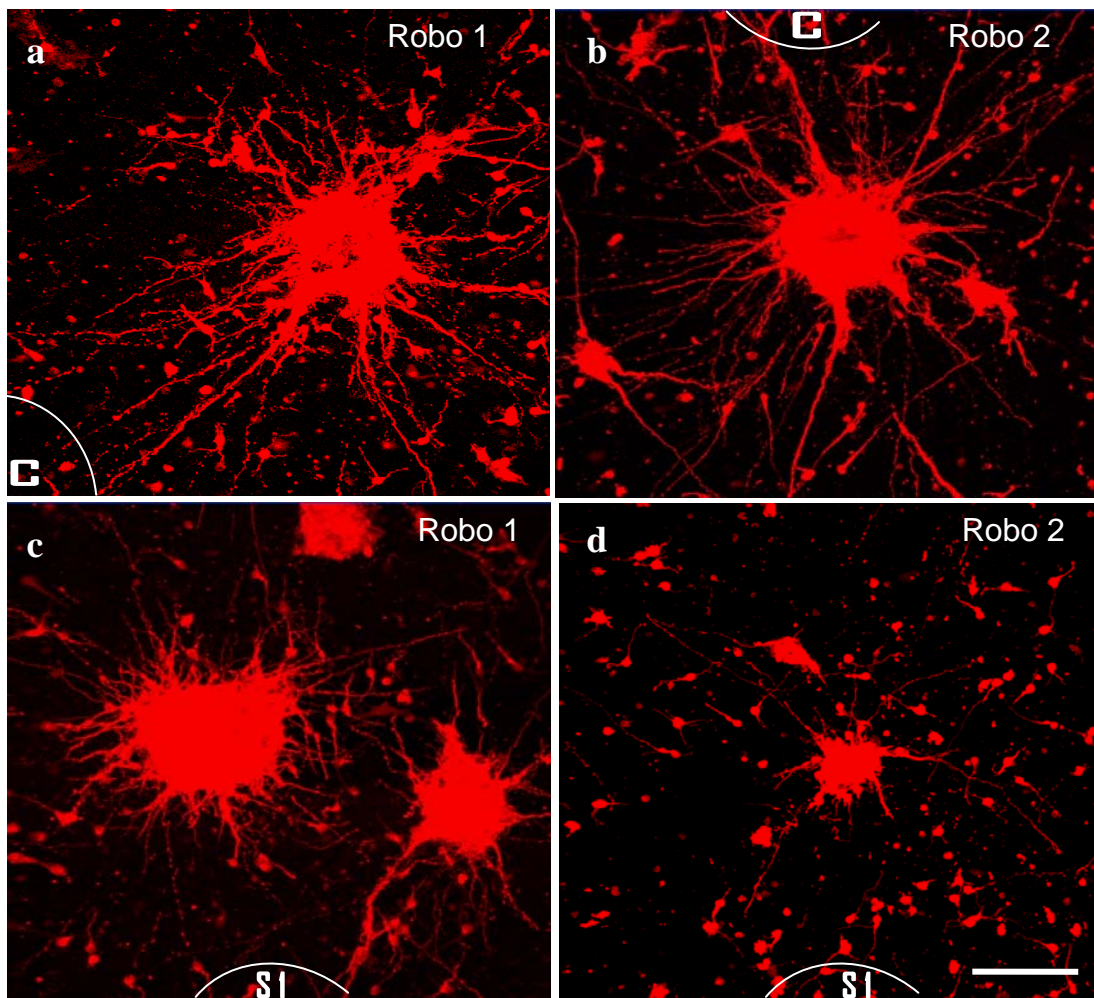


Fig. 21. CTE diferenciadas in vitro a células TH⁺ en co-cultivo con células HEK293 transfectadas con Slit 1. CTE fueron cultivadas hasta etapa V día 3 en medio final de diferenciación, fueron despegadas de la caja de cultivo, disgregadas e incluidas en geles de colágena y co-cultivadas con agregados de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para Slit 1 . Se dejaron en cultivo 48hrs, fueron fijadas e inmuno-teñidas contra TH y contra Robo 1, Robo 2 y Robo N. Se observa el crecimiento de células TH⁺/Robo⁺ en agregados de Células TH-/Robo⁺. (Barra de calibración 50 μ)

Como se observa en la Figuras 21 y 22a las neuronas Robo 1⁺ y Robo 2⁺ mostraban una inhibición del crecimiento ante Slit 1 en comparación con los controles. Por otro lado, como se muestra en las Figuras 21 y 22b las neuronas Robo⁺ no mostraron un cambio de dirección aparente por la interacción con Slit, denotando no haber una preferencia de crecimiento hacia alguna dirección con respecto a la fuente de expresión de Slit 1.

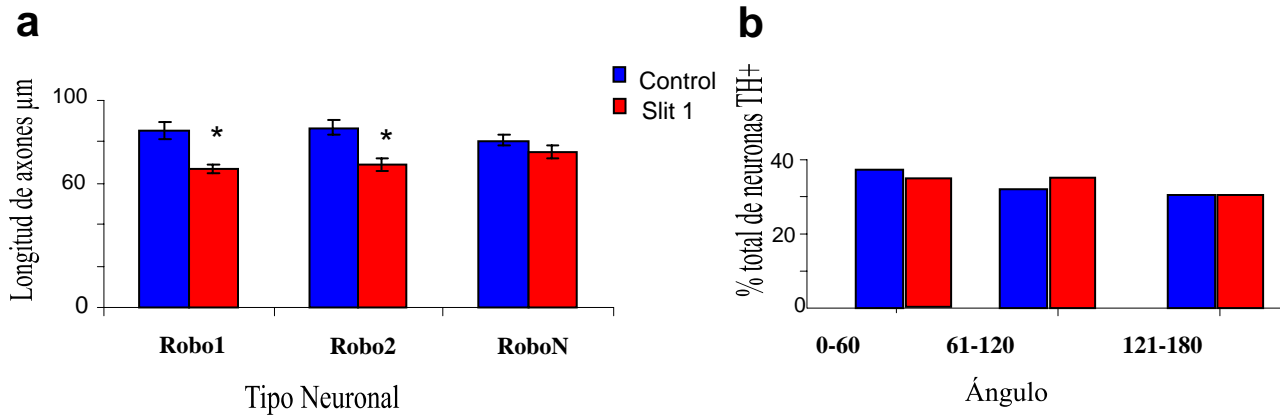


Fig. 22. Respuesta de neuronas Robo⁺ obtenidas in Vitro a partir de CTE expuestas a la molécula quimiotrópica Slit 1. A) Comparación de longitud de axones de células Robo⁺ expuestas a agregados celulares de HEK293 transfectadas con el vector para Slit 1 con respecto a agregados sin transfectar; se observa una longitud menor para los axones expuestos a Slit 1, la diferencia con los controles es significativa de acuerdo al análisis de la orientación para las neuronas Robo 1 y 2⁺. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en axones Robo N B) Orientación de axones con respecto al agregado de células HEK293 expresando Slit 1, no se observó una tendencia de orientación axonal con respecto a la fuente de expresión de Slit 1 (P>0.05). Longitud: N=473 axones Robo 1/control. N= 513 axones Robo2/control. 572 axones RoboN/control. N= 467 axones Robo1/Slit1. N= 375 axones Robo2/Slit1. N=296 axones RoboN/Slit1. Dirección: N= 998 axones Robo+/Slit1. 1004 axones Robo+/control.

8. DISCUSIÓN

8.1 EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ROBO DURANTE LA FORMACIÓN DE LA VÍA NEGRO-ESTRIAL Y SUS IMPLICACIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES.

En el presente trabajo se encontró que las neuronas TH⁺ del área VM embrionario presentan variaciones en la expresión de los receptores a Slit. Se observó que desde el inicio de la formación de la VNE en el estadio embrionario 12 hasta el 14, cuando esta vía está por llegar a su blanco, la expresión de los receptores Robo 1 y 2 es menor al 30% del total de células TH⁺; sin embargo, se encontró que en E15 la expresión de Robo 2 se incrementa hasta un 98.5%. Previamente se había descrito la expresión de los mRNA de Slit 1, 2, 3 y sus receptores Robo 1, 2, y 3 en estadios embrionarios de rata desde E15 hasta estadios adultos, sin embargo esta descripción abarcaba solamente estadios posteriores a la formación del la VNE (Marrilat et al., 2002). En esta misma dirección, Lin y sus colaboradores (2002) mediante inmunotinciones describieron la presencia de los receptores Robo 1 y 2 en estadio E14, cuando las NDA ya han proyectado y están por llegar al estriado dorsal. Estas caracterizaciones previas daban indicio de la posible participación de Slit en la VNE, debido a que los receptores se encontraban en áreas mesencefálicas e incluso en neuronas dopaminérgicas. Sin embargo no se había demostrado previamente que particularmente las neuronas dopaminérgicas del estadio E12 al 14 expresaran los receptores a Slit, sugiriendo una implicación de esta molécula en etapas tempranas de la formación de la VNE.

Estudios previos del laboratorio han mostrado por hibridación *in situ* la presencia de Slit 1 y 2 en E11 y E12 en la región ventral del mesencéfalo por lo que se presume que podría tener un papel repulsivo importante desde los primeros momentos de la proyección dirigiendo las neuronas en sentido dorsal. Por otro lado, estudios con ratones knock-out para Slit 1 y 2 han mostrado el posible rol de Slit en el posicionamiento correcto de vías dopaminérgicas, pues la ausencia de ambos genes en ratones, produce el desplazamiento ventral de tractos provenientes de la sustancia negra y del área ventral tegmental, detectado en estadio E18.5 embrionario de rata (Bagri, 2002). La baja proporción de neuronas TH⁺ que expresan receptores a Slit 1 en E12-E14 podría implicar que no se necesita una respuesta específica de todas las NDA ante las isoformas

de Slit. La interacción de las células TH⁺ con otras neuronas TH⁺/Robo⁺ ó TH⁺/Robo⁺ que sí respondan a Slit 1 podría actuar como un sistema de regulación de su crecimiento.

Por otra parte, el aumento drástico en la proporción de neuronas TH⁺ que expresan el receptor a Robo 2 en el estadio E15 hace suponer que los axones dopaminérgicos que se aproximan a regiones rostrales del prosencéfalo en el estriado responden a Slit 1, que se sabe se expresa en este estadio en el Núcleo caudado (Marrilat et al., 2002) de tal manera que no rebasan las regiones en las que se localizan sus blancos.

Sin embargo, este no es el único recurso que utiliza esta vía durante el desarrollo embrionario, se sabe que las efrinas (Yue et al., 1999), otra familia de moléculas quimiotrópicas de anclaje transmembranal, está relacionada con el colapso del crecimiento del axón y está presente en el estriado en este estadio, lo que implicaría además del freno de crecimiento realizado por Slit 1 , un “alto total” al crecimiento.

8.2 POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE AXONES TH⁺/ROBO⁺ Y AXONES TH⁺/ROBO⁻

Una observación importante que deriva de este estudio es de que las neuronas TH⁺ positivas expresan en muy baja proporción los receptores a Slit, al menos hasta el estadio 14, y que las neuronas TH⁺ que no tiene el receptor son de igual manera inhibidas en su crecimiento. Estudios previos realizados por Lin y sus colaboradores (2002) muestran un efecto de repulsión de las neuronas TH⁺ ante Slit-2 e inhibición del crecimiento ante Slit 1; sin embargo, el análisis de estos resultados se llevó a cabo con inmunotinciones sólo para identificar las neuronas TH⁺ sin determinar si existía o no la presencia de los receptores a Slit. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten suponer que no sólo la variabilidad de la expresión de los receptores para Slit 1 pareciera ser importante en la regulación del crecimiento de los axones, sino que también es relevante la interacción de los axones dopaminérgicos con otros axones que sí poseen el receptor y que fasciculan con las neuronas TH⁺. La interacción axón/axón por medio de la fasciculación se ha observado en otras poblaciones neuronales donde axones pioneros dirigen el crecimiento de otras poblaciones axonales sirviéndoles como sustrato. Por ejemplo, los axones pioneros procedentes de neuronas de la corteza cingulada o de la neo-corteza rostralateral, cruzan la línea media dando lugar al cuerpo caloso proporcionando un ejemplo muy claro de la importancia de la interacción axón-axón para formar este tracto (Rash y Richards, 2001). Hasta ahora, no hay

estudios que indiquen que estas interacciones axón-axón dependan de un tipo celular de forma preferencial para que esta regulación se lleve a cabo.

En este estudio también se obtuvo evidencia para sugerir que los axones Robo⁺ de células GABAérgicas podría actuar como facilitadores del crecimiento o inhibición de axones TH⁺/Robo⁻ durante el desarrollo embrionario de la VNE, ya que por inmunotinción hemos detectado una población GABAérgica de axones que emergen de los explantes y que están en estrecho contacto con las neuronas dopaminérgicas (ver Fig. 23). Previamente se ha reportado que los axones GABAérgicos que co-localizan con axones positivos la molécula de adhesión neuronal, TAG-1, de la corteza cerebral median la proyección de axones de neuronas de la eminencia ganglionar medial (McManos et al., 2004). Podría sugerirse entonces que la fasciculación de los axones dopaminérgicos depende de la expresión de moléculas de adhesión expresadas en células no dopaminérgicas adyacentes como TAG-1.

Estudios anteriores han reportado la presencia de axones GABA⁺ que forman parte de la VNE aunque en muy baja proporción (Rodríguez y Gonzalez-Hernandez 1999). Cabe mencionar que estos estudios fueron realizados en ratas adultas, por lo que queda abierta la posibilidad de que la presencia de neuronas GABA⁺ en mayor número y durante la proyección Negro-estriada sea un fenómeno más evidente durante la formación de la vía en etapas embrionarias. Por otro lado, la baja expresión de los receptores a Slit en neuronas TH⁺ desde E12 a E14 podría indicar que aunque Slit 1 se encuentre en la línea media en el área VM en el estadio E12, las NDA no responden a la inhibición del crecimiento, pero sí que otras neuronas TH/Robo⁺ que co-existen con éstas sí lo hacen. Otro aspecto de la posible relevancia de esta interacción es sugerida por estudios en los que se ha encontrado que neuronas GABAérgicas, liberan BDNF, el cual es un factor que induce la proliferación. Las neuronas GABA⁺ podrían entonces, ser relevantes para la proliferación de las neuronas de este núcleo dopaminérgico (Mufson et al., 1994; Aguado et al., 2003).

Otra de las posibilidades, en cuanto a la respuesta obtenida de las células TH⁺/Robo⁻ sería la presencia de un cuarto receptor para Slit, el cual no presentaría la misma estructura extracelular que los otros 3 receptores (ya que el anticuerpo Robo N detecta las 3 isoformas de Slit que comparten el mismo dominio extra celular) y más aún, que este receptor pudiera necesitar de un co-factor que normalmente se presenta en esta vía y que debido al cultivo in vitro, se esté

impidiendo dicha expresión. Recientemente se ha postulado que la interacción de Slit con sus receptores pareciera necesitar de un segundo receptor o co-factor, Syndecan, el cual es una cadena de proteoglicanos de sulfato de heparina, que se agrupan para formar este complejo y así permitir la señal de Slit (Hussain et al., 2006). Además, existe evidencia que sugiere la existencia de otro receptor para Slit, Robo 4, el cual es expresado principalmente en el endotelio vascular y que este podría tener una función en la migración de células endoteliales y en angiogénesis, aunque aún no hay evidencias de la presencia de este receptor en alguna zona del encéfalo en particular (Hohenester et al., 2006).

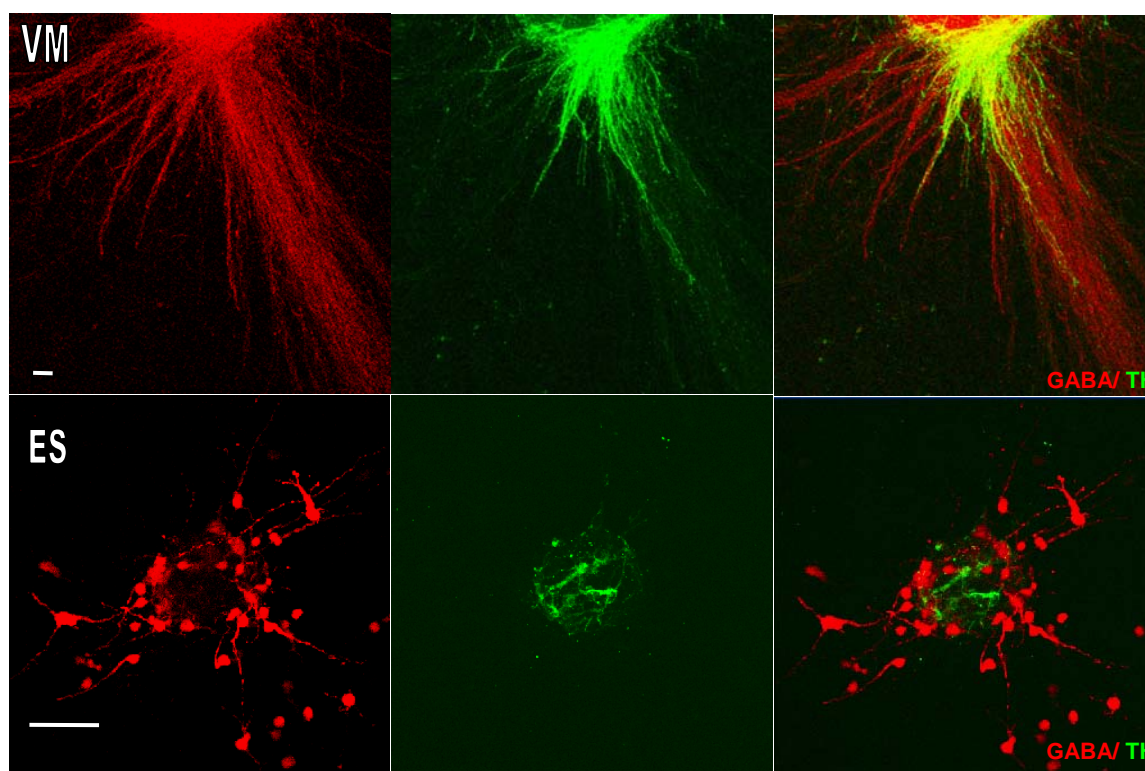


Fig. 23. Posible interacción de neuronas dopaminérgicas con células GABAérgicas en el área VM y en células TH⁺ obtenidas *in vitro* a partir de CTE. Explantes de VM E13.5 y CTE diferenciadas *in vitro* (3 días en N2+ácido ascórbico y 2 días de cultivo en gel de colágena) se inmunotiñeron contra GABA y TH. Se observa en VM una población de neuronas GABAérgicas en estrecho contacto con neuronas TH que forman parte del explante. De manera similar células GABA⁺ se observan formando parte de las colonias de CTE diferenciadas a TH⁺ (CTE). (Barra de calibración 50µm).

8.3 CTE DIFERENCIADAS IN VITRO A CELULAS TH⁺ PRESENTAN EXPRESIÓN DE RECEPTORES ROBO 1 Y 2, PERO NO RESPONDEN A SLIT 1

Debido al potencial que las células diferenciadas a partir de CTE tienen en la terapia de sustitución celular, diversos trabajos se han enfocado a la caracterización más amplia de las células TH⁺ diferenciadas in vitro. Así, diversos grupos han comparado la activación de genes, y la actividad electrofisiológica de estas células con las de las células dopaminérgicas embrionarias o adultas. Este trabajo muestra que las células TH⁺ obtenidas in vitro a partir de la diferenciación de CTE, no responden a Slit 1, aunque presentan la expresión de los receptores en niveles semejantes a lo observado para explantes de E12-E14.

La ausencia de respuesta de las células TH⁺ a la proteína Slit observada in vitro aunque esté presente el receptor, sugiere que, existen otros elementos que podrían determinar la respuesta de repulsión o inhibición del crecimiento, tales como la presencia de componentes de matriz extracelular como el Syndecan, que se une al extremo amino de Robo y es importante para la transducción de la señal mediada por este receptor (Liu et al., 2004). Por otra parte, la interacción con otras poblaciones celulares además de las células GABAérgicas presentes en el mesencéfalo, o el estado de diferenciación de las CTE podrían ser relevantes para la transducción de la señal iniciada por Slit 1. De manera consistente con nuestros resultados, Lin y colaboradores (2006) reportaron que las células CTE diferenciadas in vitro a TH⁺ por el método de co-cultivo con células estromales PA6 no responden al efecto repulsivo de Slit 1 y Slit 3 en comparación con la respuesta observada en explantes de mesencéfalo.

Por otro lado, las condiciones de los cultivos celulares, siempre implican alteraciones en cuanto a la organización que estas células presentan, a la carencia de interacciones celulares que se dan normalmente in vivo, así como a la organización de estas interacciones con la matriz extracelular. Se ha reportado, por ejemplo, que las CTE no presentan la expresión de moléculas de adhesión que facilitarían su integración a un tejido (Marchionini et al., 2003). Por lo anterior, sería importante estudiar la integración de estas células en matrices artificiales o en explantes de cerebro, las cuales proveerían información más detallada de expresión génica específica activada por la interacción con la matriz extracelular y con otras células. Así mismo sería importante continuar explorando la respuesta a otras moléculas quimiotrópicas que se sabe también están implicadas en la formación de la VNE

9. CONCLUSIONES

Las neuronas TH⁺ del área VM expresan en baja proporción los receptores a Slit 1, Robo 1 y 2 en los estadios 12 a 14 cuando se da la formación de la VNE. Esta expresión se eleva de manera considerable para el receptor Robo 2 en E15, coincidiendo con el tiempo en el que las neuronas dopaminérgicas han llegado a su blanco en el estriado, lo cual sugiere un papel importante de Slit en la esta etapa final de la formación de la vía, posiblemente impidiendo el crecimiento de éstas más allá del estriado.

El crecimiento de los axones de las neuronas del VM de E14 fue inhibido al exponerlas a Slit 1. Este efecto fue observado tanto para las neuronas Robo⁺ como las neuronas TH⁺ que carecen del receptor, por lo que se sugiere que la interacción de las neuronas TH⁺ con otro tipo neuronal también presente en el VM que posee el receptor, podría estar determinando la respuesta de las neuronas dopaminérgicas a Slit 1.

Las CTE diferenciadas in vitro a neuronas TH⁺ expresaron los receptores a Slit, Robo 1 y 2 en proporción semejante a lo observado para las neuronas TH⁺ provenientes del VM en estadios 12 a 14. Sin embargo sus axones no fueron inhibidos ni repelidos por Slit 1 como los de las neuronas del VM, lo que sugiere que existen otros factores además de la presencia del receptor que se requieren para la respuesta a esta molécula tales como interacción con otros tipos celulares presentes en el VM.

Por otro lado, células no dopaminérgicas del área ventral del mesencéfalo desde E12 a E15 expresan los receptores a Slit. Cuando los axones TH⁻ de las células del área VM expresan Robo 1, 2 e interactúan con Slit 1 se presenta una inhibición del crecimiento; si los axones de células de área VM TH⁺/Robo⁻ responden inhibitoriamente sin poseer el receptor para Slit podría indicar una fasciculación de estos axones Robo⁺ con axones TH⁺.

ABREVIATURAS

AVT	Área Ventral Tegmental
CTE	Células Troncales Embrionarias
CTE-TH ⁺	Células troncales embrionarias diferenciadas a neuronas dopaminérgicas
CT	Células Troncales
CPG	Células Precursoras Germinales
CPN	Células Precursoras Neurales
CEG	Células Embrionarias Germinales
EP	Enfermedad de Parkinson
NDA	Neuronas Dopaminérgicas
PIF	Células pequeñas intensamente fluorescentes
RR	Retrorubral
SA	Simpático-adrenal
SNpc	Sustancia Negra pars compacta
TH	Hidroxilasa de Trosina
VM	Área Ventral del Msencéfalo
VNE	Vía Negro-estrial

11. ANEXOS

11.1 PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CTE A NEURONAS TH⁺

Preparación de Fibroblastos Embrionario de Ratón (FER)

Se siembran de 1 a 2 x 10⁶ MEF células en un frasco de 25 ml con medio MEF y se incuban a 37°C con 5% de CO₂.

Se debe reemplazar medio diariamente hasta notar semi-confluencia

Se retira el medio y se agregan 10 ml de medio MEF suplementado con Mitomicina C (10µg/ml) incubándolas 3 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Remover el medio y agregar 10ml de PBS estéril

Agregar 2 ml de tripsina EDTA 0.05%, incubar por 5 min a 37°C 5% de CO₂

Dar unos golpes suaves al frasco para disgregar las células y agregar 10 ml de medio MEF para neutralizar la tripsina.

Transferir las células a tubo de 15 ml y centrifugar 5 min a 1000rpm

Contar células

Retirar sobrenadante y sembrar 3 x 10⁶ células en plato con gelatina agregando 10ml de MEF medio.

Incubar 24 hrs. 37°C 5% CO₂

Etapa 1: Expansión de células ES indiferenciadas

Retirar el medio MEF y sembrar 3 x 10⁶ células ES con 10 ml de medio KO-ES/ESGRO e incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 2 días ó hasta antes que las colonias se toquen una a otra.

Tripsinizar las células con Tripsina EDTA 0.05% y sembrar 3 x 10⁶ en caja de cultivo con gelatina.

Cultivar las células por 4 días a 37°C en 5% de CO₂ con KO-ES/ESGRO ó hasta antes que las colonias se toquen una a otra y pasar etapa 2.

Etapa 2: Formación de cuerpos embrionarios

Descartar el medio KO-ES/ESGRO y lavar con 10 ml de PBS estéril

Adicionar 1ml de tripsina EDTA 0.05% incubar 5 min a 37°C 5% CO₂

Suavemente dar unos golpes laterales a la caja para disgregar las células

Agregar 5 ml de medio KO-ES para neutralizar la tripsina

Transferir las células a un tubo de 15 ml y centrifugar 5 min a 1000 rpm

Remover el sobrenadante y resuspender las células en 5ml de KO-ES. Contar las células

Sembrar 2 x 10⁶ células en un plato para cultivar bacterias con 10 ml de medio KO-ES

Cultivarlas células a 37°C 5% de CO₂ por 4 días cambiando el medio cada 2 días de la siguiente manera.

- Retirar el medio con los cuerpos embrionarios (EB) y trasferirlos a un tubo de 15 ml. Esperar a que se asiente el botón de EB.
- Retirar el medio y agregar 10ml de medio KO-ES
- Transferir los EB la caja original de cultivo con pipeta suavemente

Etapa 3: Seleccionar las células Nestina Positivas

Transferir suavemente los EB con una pipeta a un tubo de 15 ml

Dejar de 5 a 10 min para que se asiente el botón de EB y retirar la mitad del medio
Lavar la caja de cultivo original con 5ml de KO-ES y agregarlo al tubo de 15ml
Transferir los EB a una caja de cultivo e incubar por 24 hrs. a 37°C con 5% CO₂. Durante este tiempo deben adherirse los EB.
Cambiar el medio KO-ES por 10 ml de medio ITS/Fibronectina
Cultivar las células de 6 a 8 días cambiando el medio ITS/Fibronectina cada 2 días y pasar etapa 4.

Etapa 4: Expansión de células positivas a Nestina

Remover el medio ITS/Fibronectina, lavar la caja de cultivo 2 veces con PBS estéril
Agregar 1ml de tripsina EDTA 0.05%, incubar por 5 min a 37°C 5% CO₂.
Disgregar las células con suaves golpes laterales y agregar 5 ml de medio KO-ES para neutralizar la tripsina
Transferir las células a un tubo de 15 ml y centrifugar 5 min a 1000rpm
Descartar el sobrenadante y resuspender el botón en el medio N2 +Ácido Ascórbico (AA)+FGFb, Shh y FGF8
Contar las células y sembrarlas en una caja de 24 pozos previamente recubierta con Poli-L ornithina/fibronectina.
Sembrar de 3 a 5 x 10⁵ células en 500 µl de medio N2 por pozo.
Cultivar de 4 a 6 días a 37°C con 5% CO₂. Cambiar el medio diariamente

Etapa 5: Diferenciación de neuronas dopaminérgicas

Inducir la diferenciación final cambiando el medio a N2+AA sin factores de crecimiento.
Cultivar las células de 10 a 15 días a 37°C con 5% CO₂ y cambiar el medio cada 2 días.
Una vez transcurridos los 15 días las neuronas pueden ser identificadas como dopaminérgicas usando un anticuerpo anti-TH y el de β-III Tubulina

11.2 MEDIOS DE CULTIVO

KO-ES

Knock out DMEM (Gibco, 10829-018)
15% Suero Fetal Bovino ES cell qualified (Gibco, 16000-044)
1% MEM non essential Amino acids (Gibco, 11430-030)
1% L-glutamina 200Mm (Gibco, 25030-081)
0.1% 2- mercapto-etanol 1000x (Gibco, 21985-023)
1% penicilina/estreptomicina (Gibco, 125300-062)

MEF

DMEM (Gibco, 11995)
10% Suero Fetal Bovino (previamente calentado e inactivado a 56°C)
1% L-Glutamina 200Mm
1% Penicilina/estreptomicina

N2+ ÁCIDO ASCÓRBICO

DMEM/F12 (Gibco, 11320-033)
.00155gr/ml Glucosa (Sigma)
0.2% L.Glutamina 0.4Mm
0.00169 gr/ml Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)*
1% suplemento N2 *plus* 100x (Gibco, 17502-048)
Esterilizar por filtración
Añadir 1% de penicilina/estreptomicina
Añadir 1 µl/ml de Ácido Ascórbico 200 Mm*
Ajustar Ph 7.2 ± 0.2

ITS/Fribronectina

DMEM/F12
1% ITS media supplement 100x (Sigma, 13146-5ML)
0.073 mg/ml L-Glutamina
1.5 mg/ml Glucosa
Agregar 5 µg/ml de Fribronectina*

DMEM HEK 293

DMEM
10% SFB
1% Penicilina/estreptomicina

OPTIMIX

OptiMEM (51985-034)
20% DMEM/F12
10% Suero fetal Bovino
1% Penicilina/estreptomicina
*Ver material y métodos para marca y número de catálogo

11.3 PREPARACIÓN DE CO-CULTIVO EN GELES DE COLÁGENA

PARTE 1: AGREGADO DE CÉLULAS HER293

Para 10 mini geles con 8, 000 células cada gel de 1µl de volumen

8 µl de DMEM s/suero, c/penicilina/estreptomicina al 1% (4 µl c/células y 4 µl s/células)
2 µl de colágena
0.15 µl de NaCl
0.05 µl de Bicarbonato de sodio

Nota: Hacer primero la preparación con solo 4 µl de DMEM s/suero, s/células
Precalentar 1 caja de 6cm en incubadora y simultáneamente un placa térmica a 37°C

- Colocar en un vial de 0.5 ml primero el DMEM S/suero/cel, la colágena, luego el NaCl y al final el bicarbonato. (de notar el color violeta después de colocar el bicarbonato). Dejar la preparación en hielo.
- Despegar de la caja de cultivo, contando que haya una dilución de 80,000 células en 4 µl de DMEM s/suero y resuspender.
- Agregar a la preparación los 4µl de colágena preparada (DMEM/colágena/NaCl/Bicarbonato) y los 4µl de DMEM con células. Resuspender 1 sola vez.
- Colocar la caja de 6cm sobre la placa térmica precalentada a 37°C
- Con una micropipeta, tomar 1 µl y colocar la gota en la caja sin dejar caer o embarrar en la caja (así sucesivamente con los 10 µl).
- Dejar polimerizar 40 min.

PARTE 2 CTE + HEK293 EN CO-CULTIVO

Para 10 geles grandes con 10,000 células en un volumen de 35 µl cada uno.

300 µl de DMEM s/suero, c/penicilina/estreptomicina al 1%
(150 µl c/células y 150 s/células)

75 µl de Colágena
2.5 µl de NaCl
2.5 µl de Bicarbonato de sodio

Nota: Hacer primero la preparación con solo 150 µl de DMEM s/suero, s/células.

- Colocar en un vial de 0.5 ml primero el DMEM S/suero/cel, la colágena, luego el NaCl y al final el bicarbonato. (denotar el cambio de coloración después de colocar el bicarbonato, se torna violeta la preparación). Dejar la preparación en hielo.
- Depegar las células contando una dilución de 100,000 células en 150 µl de DMEM s/suero y resuspender.

-Agregar a la preparación de colágena (DMEM/colágena/NaCl/Bicarbonato) los 150 μ l de células colocar en hielo.

-Una vez polimerizados los mini-geles despegar con un poco de PBS y alambre de tuxteno 1 gel de la caja de 6cm, colocarlo cuidadosamente en un pozo de caja de 4 pozos, retirar el exceso de PBS.

-Agregar una gota de 35 μ l de colágena con células sobre el mini-gel.

-Dejar polimerizar 1 hora

-Agregar 350 μ l de medio (el correspondiente a la etapa cuatro de diferenciación de células troncales embrionarias).

11.4 DIGESTION DE VECTOR mSLIT1CS2 CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para verificar que mSlit 1 se encontraba en el vector utilizado se realizaron 2 cortes con enzimas de restricción de acuerdo al mapa del vector (Fig 10), con el cual se localizaron los sitios para EcoR1 y Hind-III. Se realizó la diestión (ver material y métodos) y corrió cada reacción en un gel de agarosa al 1% (Fig. 11).

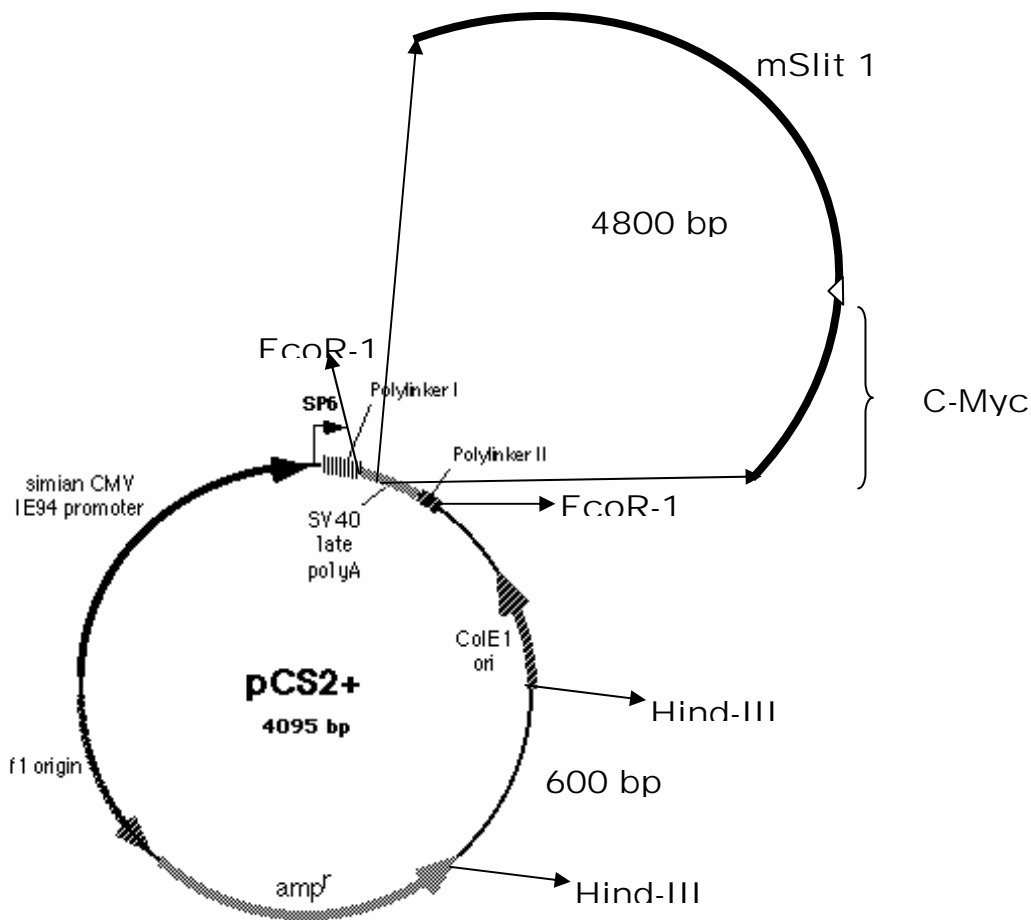


Fig. 10. Mapa del vector de expresión CS2mSlit 1 . Este vector contiene un enhancer/promotor de citomegalovirus de simio con un sitio de poliadenilación SV40; contiene el promotor SP6 unido en el extremo 5' de citomegalovirus. También posee un promotor T7 en orientación reversa entre El polilinker 1 y el polilinker II para proveer transcripción de RNA por medio de SP6. Mapa modificado del CS2 vector Resourse, University of Michigan.

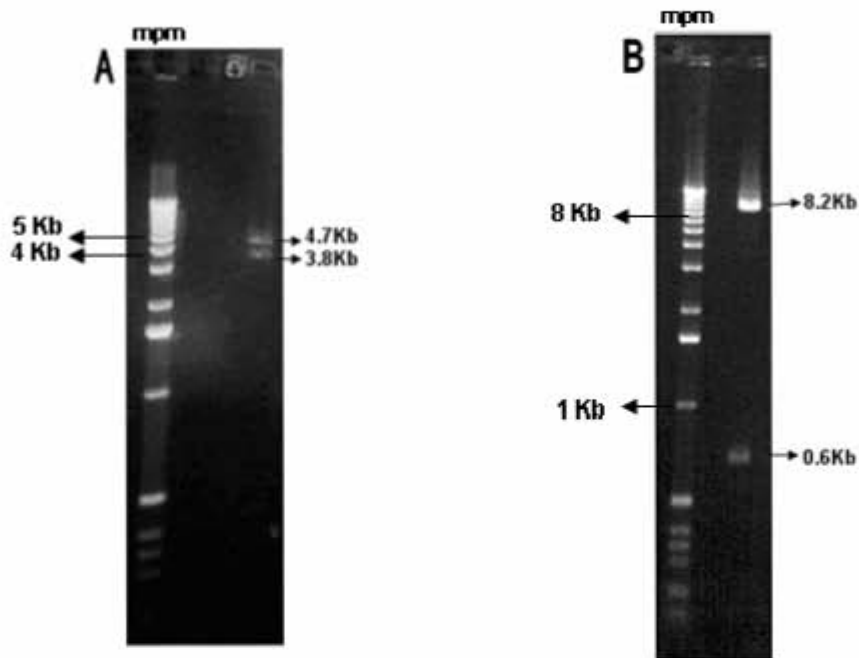


Fig. 1. Digestión del Vector mSlit1CS2 con enzimas de restricción EcoR1 y HindIII.

El vector de expresión para la proteína Slit 1 mSlit1CS2 se digirió con EcoR1 (A) ó HindIII (B). El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1%. Para EcoR1 se observan las bandas esperadas de 3.8 kb y 4.7 kb; no se observa la banda de 0.3 kb debido a la concentración del gel de agarosa. En el caso de la digestión con la enzima Hind III, se observan las 2 bandas esperadas de 0.6 kb y 8.2 kb. kb: kilobases.

10. REFERENCIAS

Aguado F, Carmona M, Pozas E, Aguiló A, Martínez-Guijarro F, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibáñez C y Soriano E. 2003. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development*. 130, 1267-1280

Bagri A, Morin O, Pluma A, Mak J, Pleasure S, Rubinstein J y Tessier-Lavigne M. 2002. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian brain. *Neuron*. 33, 233-248

Baizabal J, Furlan Magaril M, Santa-Otalla J y Covarrubias L. 2003. Neural Stem cells in development and regenerative medicine. *Archives of Medical Research*. 34, 572-588

Barberi T, Klivenyl P, Calingasan N, Hyojin L, Kawamata H, Loonam K, Perrier A, Bruses J, Rubio M, Topf N, Tabar V, Harrison N, Beal F, Moore M y Studer L. 2003. Neural Subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat. Biotechnol.* 10, 1200-1207

Bentivoglio M y Morrelli M. 2005. The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. En: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier. 21, Capítulo 1, 1-104

Björklund L, Sanchez-Pernaute R, Chung s, Andersson T, Yin Ching Chen I, McNaught K, Brownwill A, Jenkins B, Wahlestedt C, Kim K e Isacson O. 2002. Embryonic stem cells into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *PNAS*. 4, 2344-2349

Boyd A, Higashi Y y Wood K. 2005. Transplanting stem cells: Potential targets for immune attack. Modulating the immune response against embryonic stem cell transplantation. *Adv Drug Deliv Rev*. 13, 1944-1969

Brose K, Bland K, Wang K, Arnott D, Henzel W, Goodman C, Tessier-Lavigne M, y Kidd T. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*. 96, 795-806

Brose K y Tessier-Lavigne M. 2000. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol*. 10, 95-102

Cabin D, Shimazu K, Murphy D, Cole N, Gottschalk W, McIlwain K, Orrison B, Chen A, Ellis C, Paylor R, Lu B y Nussbaum R. 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*. 22, 8797-8807

Cardoso S, Oliveira C, Moreira P, Agostinho P y Pereira C. 2005. Neurodegenerative pathways in Parkinson's disease: therapeutic strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 4, 405-419

Chen H, He Z y Tessier-Lavigne M. 1998. Axon guidance mechanisms: semaphorins as simultaneous repellents and anti-repellents. *Nat Neurosci*. 1, 436-439

Chen J, Wu J, Wen L, Dupuis S y Rao Y. 2001. The N-terminal Leucine-Rich Regions in Slit Are Sufficient To Repel Olfactory Bulb Axons and Subventricular Zone Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 21(5), 1548-1556

Chinta SJ, Andersen JK. 2005. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*.. 37: 942-946.

Choi J, Lee SY, Cho Y, No H, Kim S y Hwang O. 2005. Tetrahydrobiopterin causes mitochondrial dysfunction in dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 48, 255-262

Choi J, Sullards M, Olzmann J, Rees H, Weintraub S, Bostwick D, Gearing M, Levey A, Chin L, Li L. 2006. Oxidative Damage of DJ-1 Is Linked to Sporadic Parkinson and Alzheimer Diseases. *J Biol Chem*. 281, 10816-10824

Chung S, Sonntag K, Andersson T, Bjorklund L, Park J, Kim D, Kang U, Isacson O y Kim K. 2002. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci.* 10, 1829-1838

Dent E, Gertler F. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron.* 40, 209-27.

Drucker-Colin R y Verdugo-Díaz. 2003. Cell transplantation for Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 3, 301-316

Elowe S, Holland S, Kulkarni S y Pawson T. 2001. Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol.* 21, 7429-7441

Fernandez-Espejo E, Armengol J, Flores J, Galan-Rodriguez B, Ramiro S. 2005. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease. *Brain Res Rev.* 49, 343-54

Ferreri F, Agbokou C y Gauthier S. 2006. Recognition and management of neuropsychiatric complications in Parkinson's disease. *CMAJ.* 175, 1545-52

Fluckiger A, Dehay C y Savatier P. 2003. Cellules souches embryonnaires et thérapies cellulaires du système nerveux. *Medicine sciences.* 19, 699-708

Gates M, Coupe V, Torres E, Fricker-Gates R y Dunnett S. 2004. Spatial and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *European Journal of neuroscience.* 19, 831-844

Gerfen C. & Wilson C. The basal ganglia Chapter II. En: *Handbook of chemical Neuroanatomy.* El Servier, 1996.

Goldman S. 2005. Stem and progenitor cell based therapy of the human central nervous system. *Nature biotechnology*. 23, 862-871

Goren B, Kahveci N, Eyigor O, Alkan T, Korfali E y Ozluk K. 2005. Effects of intranegrol vs. intrastriatal fetal mesencephalic neural grafts on motor behavior disorders in a rat Parkinson model. *Surg Neurol*. 64, 33-41

Haque N, LeBlanc C e Isacson O. 1997. Differential dissection of the rat E16 ventral mesencephalon and survival and reinnervation of the 6-OHDA-lesioned striatum by a subset of aldehyde dehydrogenase-positive TH neurons. *Cell Transplant*. 6, 239 –248

Hernández-Montiel, H., Tamariz E, Sandoval-Minero M, y Alfredo Varela-Echavarría. 2005. Semaphorins 3A, 3C, and 3F on Mesencephalic Dopaminergic Axon Guidance. *The journal of comparative neurology*. 506 (en prensa)

Huber A, Kolodkin A, Ginty D y Cloutier J. 2003. Signaling at the growth cone: Ligand-Receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev. Neurosci*. 26, 509-563

Hohenester E, Hussain S, Howitt JA. 2006 Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans. Pt 3*: 418-21.

Isacson O, Bjorklund L y Pernaute R. 2001. Parkinson's disease: interpretations of transplantation study are erroneous. *Nat Neurosci*. 4, 553

Isacson O, Bjorklund L y Schumacher J. 2003. Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann Neurol*. 53, 135-148

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa S y Sasai Y. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 28, 31– 40

Kennedy T, Serafini T, de la Torre J y Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 78, 425-435

Kim J, Auerbach J, Rodriguez-Gomez J, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee S, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankeiewicz K y McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of parkinson's disease. *Nature*. 418, 50-56.

Kim D, Chung S, Hwang M, Ferree A, Tsai H, Park J, Chung S, Nam T, Kang U, Isacson O y Kim K. 2006. Stromal cell-derived inducing activity, Nurr1, and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 3, 557-567

Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T y Fujisawa H. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron*. 5, 995-1005.

Klein C y Schlossmacher M. 2006. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol*. 3, 136-146

Kolodkin A, Levengood D, Rowe E, Tai Y, Giger R y Ginty D. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*. 4, 753-762.

Lee S, Lumelsky N, Studer L, Auerbach J y McKay R. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 18, 675-679.

Liem K, Tremml G, Jessell T. 1997. A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell*. 91,127-38.

Lindvall O y McKay R. 2003. Brain repair by cell replacement and regeneration. *PNAS*. 100, 7430-7431

Lindvall O. 2003. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacological Research*; 47, 279-287

Lin L, Rao Y, Isacson O. 2005. Netrin-1 and Slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neuroscience*. 28, 547-555

Lin L y Isacson O. 2006. Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by Netrin-1 and Slits. *Stem Cells*. 11, 2504-1253

Liu Z, Patel K, Schmidt H, Andrews W, Pini A y Sundaresan V. 2004. Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding *Mol. Cell. Neurosci*. 26, 232– 240

Marchionini D, Collier T, Camargo M, McGuire S, Pitzer M y Sortwell C. 2003. Interference with anoikis-induced cell death of dopamine neurons: implications for augmenting embryonic graft survival in a rat model of Parkinson's disease. *J Comp Neurol*. 464,172-179

Marrilat V, Nguyen-Ba-Charvet, Cases O, K, Tessier-Lavigne M, Sotelo C y Chedotal A. 2002. Spatiotemporal expression patterns of Slit and Robo genes in the rat brain.. *The journal of comparative neurology*. 442, 130-155

McManus M, Nasrallah I, Gopal P, Baek W y Golden J. 2004. Axon mediated interneuron migration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 63, 932-941

Mendez I, Sanchez-Pernaute R, Cooper O, Vinuela A, Ferrari D, Bjorklund L, Dagher A y Isacson O. 2005. Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain*. 128, 1498-1510

Ming G-L, Song H-J, Berninger S, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo M-M. 1997. cAMPdependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron*. 19,1225–1235

Moore D, West A, Dawson V y Dawson T. 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 28, 57-87

Mufson E, Kroin J, Sobreviela T, Burke M, Kordower J, Penn R y Miller J. 1994. Intrastratial infusions of brain-derived neurotrophic factor: retrograde transport and colocalization with dopamine containing substantia nigra neurons in rat. *Exp Neurol.* 129, 15-26

Munro E. 2007. Asymmetric cell division: a CAB driver for spindle movements. *Curr Biol.* Aug 21;17(16):R639-41

Nakamura S, Ito, Y, Shira-Saki R y Munakami F. 2000. Local directional cues control growth polarity of dopaminergic axons along the rostrocaudal axis. *The journal of neuroscience.* 20, 4112-4119

Nguyen-Ba-Charvet K, Plump A, Tessier-Lavigne y Chedotal A. 2002. Slit 1 and Slit 2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *The journal of Neuroscience.* 22, 5473-5480

Nguyen-Ba-Charvet K y Chedotal A. 2002 Role of Slit proteins in the vertebrate brain. *Journal of Physiology.* 96, 91-98

Ohtsuka S, Dalton S. 2007 Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Ther.* 1-8

Pahwa R y Lyons K. 2003. Deep Brain stimulation in parkinson disease. Chapter 23 En *Handbook of Parkinson disease.* New York

Pan Y, Chen X, Wang S, Yang S, Bai X, Chi X, Li K, Liu Bin y Li L. 2005. In vitro neuronal differentiation of culture human embryonic germ cells. *Biochemical and Biophysical research Communications.* 327, 548-556

Parish CL, Parisi S, Persico MG, Arenas E y Minchiotti G. 2005. Cripto as a target for improving embryonic stem cell-based therapy in Parkinson's disease. *Stem Cells*. 23, 471-476

Polleux F, Morrow T y Ghosh A. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*. 404:567-573

Prakash N, Wurst W. 2007 A Wnt signal regulates stem cell fate and differentiation in vivo. *Neurodegener Dis*. 4, 333-338.

Rao J. Neurochemistry of nigral degeneration. Chapter 10. En: *Handbook of Parkinson disease*. New York, 2003. 221-249

Rodríguez-Gómez J, Lu J, Velasco I, Rivera S, Zoghbi S, Liow J, Musachio J, Chin F, Toyama H, Seidel J, Green M, Thanos P, Ichise M, Pike V, Innis R, McKay R. 2007. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells*. 25:918-28

Rodriguez M y Gonzales Hernandez T. 1999. Electrophysiological evidence for a GABAergic Negrostriatal pathway. *Journal of Neuroscience*. 10, 4682-4694

Rohwedel J, Sehlmeier U, Shan J, Meister A y Wobus A. 1996. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int*. 20, 579-587

Roussa E y Krieglstein K. 2004. Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8, and TGF-beta. *Cell Tissue Res*. 318, 23-33

Sabatier C, Plump A, Le Ma, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee E y Tessier-Lavigne M. 2004. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell*. 117, 157-169

Samuel M y Lang A. 2003. Lesions Surgeries. Chapter 22. En: Handbook of Parkinson Disease. New York

Santiago a y Factor S. Levodopa. 2003. Chapter 17. En: Handbook of parkinson disease. New York

Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Kikuchi J, Yokoyama S, Yamada S, Kawahara H, Yokosawa H, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K y Kato K. 2003. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. EMBO Rep. 4, 301-306

Schapira A, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge G, Ferger B, Hengerer B, Hirsch E, Jenner P, Le Novère N, Obeso J, Schwarzschild M, Spampinato U, Davidai G. 2006. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. Nat Rev Drug Discov. 5, 845-854

Serafini T, Kennedy T, Galko M, Mirzayan C, Jessell T y Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. Cell. 78, 409-424

Shamah S, Lin M, Goldberg J, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve R, Corfas G, Debrant A y Greenberg M. 2001. EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. Cell. 105, 233-244

Sherer T, Betarbet R, Stout A, Lund S, Baptista M, Panov A, Cookson M, y Greenamyre J. 2002. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. J Neurosci. 22, 7006-7015

Shults C, Haas R, Passov D y Beal M. 1997. Co-enzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. Ann Neurol. 42, 261-264.

Sundaresan V, Mambetisaeva E, Andrews W, Annan A, Knoll B, Tear G y Bannister L. 2004. Dynamic expression patterns of Robo (Robo1 and Robo2) in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 468, 467-481.

Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y y Hashimoto N. 2005. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest.* 115, 102-109

Tamada A, Shirasaki R y Murakami F. 1995. Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron.* 14, 1083-1093

Tessier-Lavigne M y Goodman C. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274, 1123-1133

Thompson, W. (1890). Successful brain grafting. *N.Y. Med. J.* 51:701–702.

Valente E, Abou-Sleiman P, Caputo V, Muqit M, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio A, Healy D, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks W, Latchman D, Harvey R, Dallapiccola B, Auburger G y Wood N. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304, 1158-1160

Vikis HG, Li W, He Z, Guan KL. 2000. The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a liganddependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 12, 457–462

Wang K, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman C, Henzel W y Tessier-Lavigne M. 1999. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell.* 96, 771-784

Youdim M. 2003. What have we learnt from CDNA microarray gene expression studies about the role of iron in MPTP induced neurodegeneration and Parkinson's disease? *J Neural Transm Suppl.* 73-88

Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Sahara T, Uchiyama Y y Okano H. 2004. Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci Lett.* Jun. 363, 33-37

Yue Y, Widmer D, Halladay A, Cerretti D, Wagner G, Dreyer J y Zhou R. 1999. Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J Neurosci.* 19, 2090-2101.