



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE LA GLÍA FAVORECE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

: M. en C. DANIEL ÉDGAR CORTÉS PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO **INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN **INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

CELULAR INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO
DE LA GLÍA FAVORECE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. DANIEL ÉDGAR CORTÉS PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL

IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. Enero, 2017

AGRADECIMIENTOS

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

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

Dra. Lourdes Massieu Trigo Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Susana Castro Obregón Instituto de Biotecnología, UNAM

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

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Papiit-IN208713) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 131281 / 256092 y Red temática Células Troncales y Medicina Regenerativa).

A CONACyT por el apoyo con una beca de doctorado durante la realización de mis estudios (CVU/Becario): 204689/202606.

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas

Al “programa de apoyo a los estudios de posgrado” (PAEP) por el apoyo otorgado durante para la asistencia al Taller de Pabsela

Al Jurado de mi examen doctoral constituido por:

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Leonor Pérez Martínez | Instituto de Biotecnología |
| Julio Morán Andrade | Instituto de Fisiología Celular |
| Ignacio Camacho Arroyo | Facultad de Química |
| Rocío Salceda Sacallanes | Instituto de Fisiología Celular |
| Fatuel Tecuapetla | Instituto De Fisiología Celular |

Los anticuerpos monoclonales Islet-1 desarrollado por Thomas M. Jessel y Susan Brenner-Morton fueron obtenidos del Developmental Studies Hybridoma Bank desarrollados bajo el auspicio del NICHD y mantenidos en la Universidad de Iowa, departamento de Biología, Cd. De Iowa. IA 52242, USA. El cDNA humano de GDNF (hGDNF) fue un amable obsequio de la Dr. Martha C. Bohn del Children's Memorial Research Center

Dedicatoria

A mi madre, siempre a ti madre, que solo me enseñaste dos cosas; decirme como andar y segundo, que no se necesita ninguna otra enseñanza

A mi padre por siempre estar ahí cuando lo he necesitado

A mi hermana por ser el hilo de nuestra familia

A Iván por el apoyo académico y personal, más tutores como tú

A todos los integrantes del laboratorio, pasados y actuales (¡son tantos ya!) por hacer de este, un lugar más ameno para trabajar

A mi amada universidad, tú me has formado

A todos las personas que me han apoyado, a las que siguen creyendo en mí

A mi vapuleado país

Contenido

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 5 |
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| ANTECEDENTES..... | 10 |
| DESARROLLO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS (NDA) DE CEREBRO MEDIO Y MOTONEURONAS (MN _s) ESPINALES | 10 |
| PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO | 10 |
| FORMACIÓN DEL TUBO NEURAL..... | 11 |
| REGIONALIZACIÓN DEL TUBO NEURAL | 12 |
| NDA MESENCEFÁLICAS..... | 14 |
| DESARROLLO DE LAS MN _s ESPINALES..... | 17 |
| CÉLULAS TRONCALES | 22 |
| DEFINICIÓN | 22 |
| HISTORIA DE LAS CÉLULAS TRONCALES | 23 |
| CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (ESC) | 26 |
| OTRAS CÉLULAS TRONCALES | 27 |
| UTILIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES | 28 |
| CÉLULAS TRONCALES Y EL SISTEMA NERVIOSO..... | 29 |
| FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DE LA GLÍA (GDNF) | 32 |
| ESTRUCTURA..... | 32 |
| RECEPTORES | 32 |
| PROPIEDADES BIOLÓGICAS..... | 32 |
| EFECTOS SOBRE LAS NDA | 33 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 35 |
| HIPÓTESIS..... | 36 |
| OBJETIVO..... | 36 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 36 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 37 |
| CONSTRUCCIÓN LENTIVIRAL | 37 |
| PRODUCCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CONTROL (CTRL-ESC) Y QUE SOBREENPRESAN GDNF (GDNF-ESC): | 37 |
| GENOTIPIFICACION | 37 |
| WESTERN BLOT..... | 37 |

| | |
|--|----|
| ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN ACOPLADO A ENZIMA PARA LA DETECCIÓN DE GDNF | 38 |
| DIFERENCIACIÓN DE ESC A NDAs..... | 38 |
| PRODUCCIÓN DE LAS LÍNEAS REPORTERAS PARA MONITOREAR LA DIFERENCIACIÓN A MNs ... | 38 |
| DIFERENCIACIÓN DE MOTONEURONAS A PARTIR DE ESC..... | 39 |
| ENSAYOS DE TOXICIDAD..... | 39 |
| INMUNOFLUORESCENCIA | 39 |
| ELECTROFISIOLOGÍA..... | 39 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 40 |
| RESULTADOS..... | 41 |
| GENERACIÓN DE ESC QUE EXPRESAN GDNF | 41 |
| GDNF-ESC POSEEN UNA MAYOR DIFERENCIACIÓN HACIA NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE CEREBRO MEDIO..... | 44 |
| LA SOBREENPRESIÓN DE GDNF HACE RESISTENTES A LAS NDA ANTE LA TOXINA 6-OHDA <i>IN VITRO</i> | 47 |
| LAS CÉLULAS GDNF-ESC PRODUCEN MÁS PRECURSORES DE MNs Y UN MAYOR NÚMERO DE MNs POSTMITÓTICAS..... | 49 |
| LA ADICIÓN TEMPRANA DE GDNF FAVORECE LA DIFERENCIACIÓN DE MNs..... | 52 |
| LA SOBREENPRESIÓN DE GDNF INCREMENTA LA EXCITABILIDAD DE LAS MNS DERIVADAS DE LAS ESC..... | 53 |
| LAS MNS DERIVADAS DE LAS GDNF-ESC/HB9::GFP SON MÁS RESISTENTES A LA EXCITOTOXICIDAD POR KAINATO. | 59 |
| DISCUSIÓN..... | 60 |
| CONCLUSIÓN | 64 |
| PERSPECTIVAS | 64 |
| REFERENCIAS..... | 65 |
| ANEXO I, ARTÍCULO ORIGINAL PUBLICADO: Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation, Differentiation, Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells..... | 72 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|---|
| 6-OHDA. | 6 hidroxidopamina |
| AAAD | Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (del inglés) |
| DNAc | Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés) |
| DNAg | Ácido desoxirribonucleico genómico (del inglés) |
| AP | Potencial de acción (del inglés) |
| AR | Ácido retinoico |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensajero |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés) |
| BMP4 | Proteína morfogenética osea (del inglés) |
| BO | Bulbo olfatorio |
| Calb | Calbindina |
| CAT | Células de amplificación transitoria |
| Chat | Colín acetil transferasa |
| cPPT | Tracto de polipurinas central (del Inglés) |
| CRM | Corriente rostral migratoria |
| CTN | Células troncales neurales |
| CTRL | Control |
| CTRL-ESC | Células troncales embrionarias transducidas con un lentivirus vacío o control |
| CTRL-ESC/ HB9::GFP | CTRL-ESC que además expresan de GFP bajo el promotor H9 |
| dAMP _c | Dibutilil adenosina monofosfato cíclico |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DCC | Ausente en cáncer colorrectal (del inglés) |
| DIC | Dicroico |
| DMEM | Medio Águila modificado de Dubelco (del inglés) |
| EB | Cuerpos embrioides (del inglés) |
| EF1 α | Factor de elongación 1 alfa (del Inglés) |
| ELISA | Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima (del inglés) |
| En 1/2 | Engrailed 1/2 |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| ESC | Células troncales embrionarias (del inglés) |
| Esrrb | Receptor beta relacionado a estrógeno (del inglés) |
| Fak | Cinasa de adhesión focal (del inglés) |
| FGF | Factor de crecimiento fibroblástico (del inglés) |
| GABA | Ácido gama aminobutírico (del inglés) |
| GAD | Descarboxilasa de ácido glutámico (del inglés) |
| GAPDH | Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (del inglés) |
| GD | Giro dentado |
| GDF11 | Factor de crecimiento y diferenciación 11 (del inglés) |
| GDNF | Factor neurotrófico derivado de la glía (del inglés) |
| GDNF-ESC | ESC que sobreexpresan GDNF de forma constitutiva |

| | |
|-----------------------|--|
| GDNF-ESC/ HB9::GFP | GDNF/ESC y que expresan la GFP bajo el promotor HB9 |
| GFP | Proteína verde fluorescente (del inglés) |
| GFR α 1 | Receptor para GDNF alfa 1 |
| GIRK2 | Canal de potasio rectificador entrante acoplado a proteína G |
| HEK293FT | Células de riñón embrionario humano línea 293 (del inglés) |
| hESC | ESC humanas |
| hGDNF | GDNF humano |
| HMC | Columna motora hipaxial (del inglés) |
| HOX | Homeótico |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| iPSC | Células pluripotenciales inducidas (del inglés) |
| IRES | Sitio de entrada interno del ribosoma (del Inglés) |
| Isl1 | Isl1 |
| kDa | kilo Dalton |
| Klf4 | factor parecido a krupel 4 (del inglés) |
| KO | Knock out |
| LIF | Factor inhibidor de la leucemia (del inglés) |
| LMC | Columna motora lateral (del inglés) |
| LTR | Repetición terminal larga (del Inglés) |
| MAP | Proteína asociada a los microtúbulos (del inglés) |
| MAPK | Cinasa de la proteína activada por mitosis (del inglés) |
| MCS | Sitio múltiple de clonación (del inglés) |
| MMC | Columna motora medial (del inglés) |
| MNs | Motoneuronas |
| N-CAM | Molécula de adhesión celular-neuronal (del inglés) |
| NDAs | Neuronas dopaminérgicas |
| NGF | Factor de crecimiento neural (del inglés) |
| Ngn2 | Neurogenina 2 |
| Nurr1 | Receptor nuclear relacionado 1 (del inglés) |
| PBS | Solución tampón de fosfatos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PGC | Columna preganglionar |
| pHH3 | Fosfo-histona H3 |
| Pi3k/Akt | Cinasa de Fosfo inosítido-3 |
| pMN | Precusores de motoneuronas |
| Raldh1 | Retinaldheído deshidrogenasa 1 |
| RAP | Potencial de acción de rebote (del inglés) |
| RMP | Potencial de membrana en reposo |
| RRE | Elemento regulatorio de REV |
| RT-PCR | Transcriptasa-reversa PCR |
| SHH | Sonic Hedgehog |
| SNpc | Sustantia nigra pars compacta |
| SSEA | Antígeno embrionario etapa específico (del inglés) |
| TARDBP | Proteína de unión a DNA TAR (del inglés) |
| TGF β | Factor crecimiento transformante beta (del inglés) |
| TH | Tirosina hidroxilasa |

| | |
|-------|--|
| TTX | Tetrodotoxina |
| vAChT | Transportador vesicular de Acetil colina (del inglés) |
| VL | Ventrículo lateral |
| VMAT | Transportador vesicular de monoaminas (del inglés) |
| VTA | Área ventral tegmental (del inglés) |
| WPRE | Elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis Woodchuck |
| ZSG | Zona subgranular |
| ZSV | Zona suventricular |

RESUMEN

Las células troncales embrionarias (ESC) son pluripotenciales y por tanto pueden diferenciarse en cualquier tejido adulto. Incluso, pueden diferenciarse específicamente en neuronas dopaminérgicas (NDAs) y motoneuronas (MNs). Aunque se ha estudiado el efecto neuroprotector del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) en estas neuronas, se desconoce si posee algún efecto durante la proliferación y especificación. En este trabajo, desarrollamos una línea de ESC que secreta GDNF constitutivamente, desde un estado pluripotencial, hasta la obtención de NDAs. En las células secretoras de GDNF (GDNF-ESC) se logró obtener un mayor número de NDAs; además, marcadores específicos de células del mesencéfalo aumentaron al doble respecto al control (CTRL-ESC). Al retarlas con la neurotoxina 6-hidroxidopamina, un mayor número de NDAs sobrevive al estímulo lesivo. También diferenciamos las ESC a MNs; y en las células que sobreexpresan GDNF, se observó un aumento en la proliferación específica de los progenitores de MNs (Olig2+); lo cual se refleja al encontrar que prácticamente todas las neuronas son MNs. Para probar en qué periodo de la diferenciación es necesario GDNF agregamos GDNF recombinante a las CTRL-ESC, y aunque es necesario en todo el proceso de diferenciación, su efecto es mayor al inicio de la misma; este aumento, se abate al agregar un anticuerpo neutralizante para GDNF. Generamos ESC que expresan la proteína verde fluorescente bajo el promotor de HB9, presente en MNs para identificarlas y realizar registros electrofisiológicos. Las GDNF-ESC poseen un mayor número de potenciales de acción y mayores signos de maduración sináptica. En presencia de GDNF, las MN son más resistentes a la excitotoxicidad por kainato. En general, GDNF promueve la proliferación y diferenciación neuronal de las ESC; así como la maduración y supervivencia.

ABSTRACT

Embryonic stem cells (ESC) have been differentiated towards motor or dopaminergic neurons. Although neurotrophic factors promote neuronal survival, their role in neuronal commitment is elusive. Here we developed mouse ESC lines constitutively releasing Glial-derived neurotrophic factor (GDNF); these GDNF-ESC differentiated more efficiently than controls to mesencephalic dopaminergic neurons. Upon challenge with the neurotoxin 6-hydroxy-dopamine, GDNF was protective for such neurons. To further explore GDNF actions, Motoneurons differentiation was performed. In GDNF-overexpressing cells a significant increase in proliferative motoneuron precursors positive for Olig2 was found. At terminal differentiation, almost all differentiated neurons express phenotypic markers of motoneurons in GDNF cultures, with lower proportions in control cells. To test if the effects of GDNF were present at early differentiation stages, addition of exogenous recombinant human GDNF was made in control ESC, also resulting in enhanced motor neuron differentiation; this effect was abolished by the co-addition of neutralizing anti-GDNF antibodies, strongly suggesting that differentiating ESC are responsive to GDNF. Using a GFP reporter for HB9 expression, identified motoneurons were electrophysiologically recorded. Motoneurons derived from GDNF-expressing cells exhibited a higher number of evoked action potentials, and more mature phenotypes as reflected by the presence spike frequency adaptation, inward rectification and rebound action potentials, as well as spontaneous synaptic and action potentials. Excitotoxicity induced by kainate was more pronounced in control cells compared to GDNF-ESC. Altogether, these data indicate that GDNF promotes proliferation and neuronal differentiation from pluripotent cells, also enhancing maturation and conferring neuroprotection. GDNF-expressing ESC can be useful in studies of development and disease.

ANTECEDENTES

DESARROLLO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS (NDA) DE CEREBRO MEDIO Y MOTONEURONAS (MNs) ESPINALES

PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO

Durante el desarrollo temprano el ovocito fecundado comienza a dividirse para formar la mórula, una masa compacta de células que posteriormente cavitara para formar el blastocisto. En su interior, una acumulación focal de células denominada la masa celular interna originará un disco bilaminar conformado por el epiblasto y el hipoblasto. Del primero, surgirán por medio de un fenómeno conocido como gastrulación, las tres capas embrionarias que darán origen a todas las células del organismo; estas son endodermo, mesodermo y ectodermo. Del primero, derivan la mayoría de las vísceras contenidas en las cavidades torácica y abdominal. Del mesodermo esencialmente huesos y músculo esquelético, sistema circulatorio y

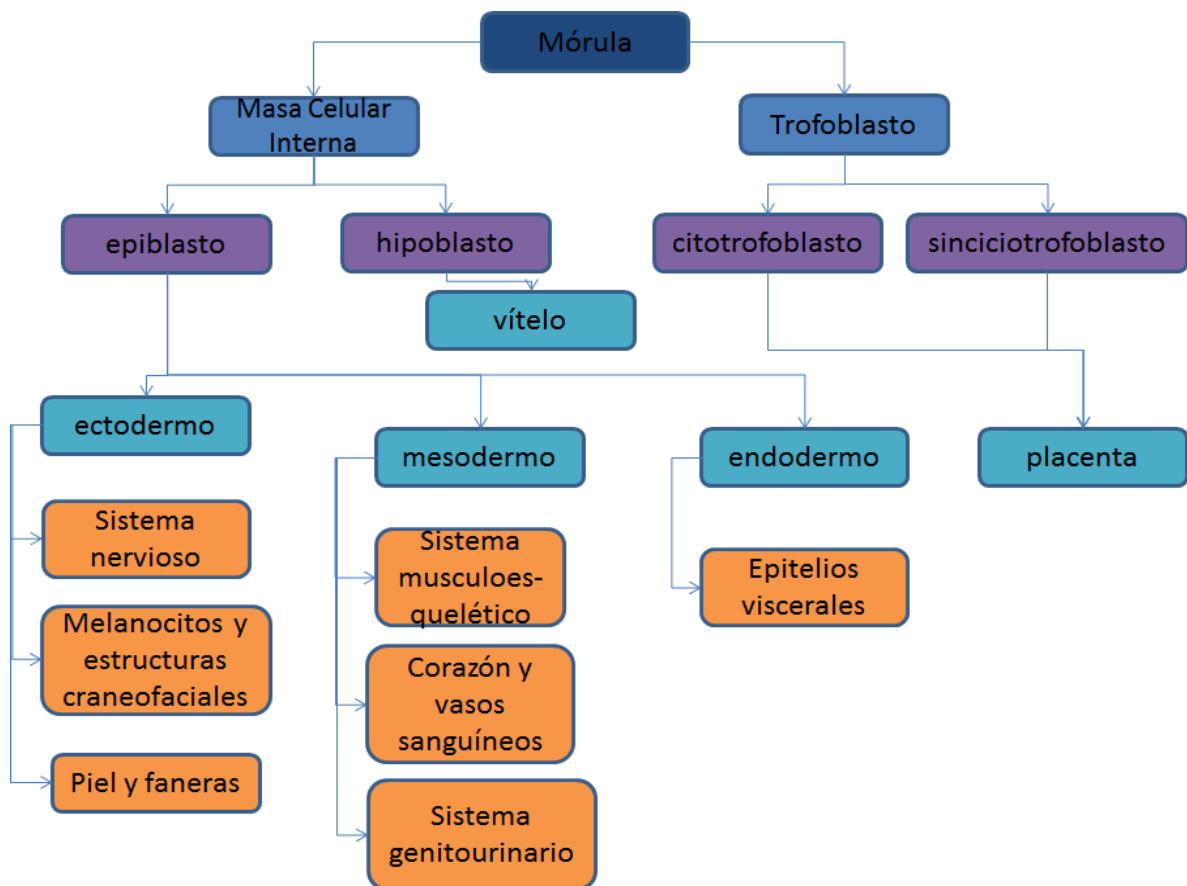


Fig. 1. Diagrama de desarrollo y diferenciación de los cordados a partir de una célula pluripotencial (mórula) hasta cada una de las estirpes celulares especializadas de todos los aparatos y sistemas de un organismo adulto.

urinario así como la corteza suprarrenal. Por último el ectodermo genera todo el sistema tegumentario y faneras, la médula suprarrenal, mesénquima craneal y todos los derivados neurales tanto del sistema nerviosos central como del periférico [1] (fig. 1).

FORMACIÓN DEL TUBO NEURAL

Al establecerse los patrones de las capas germinales se forma también el nódulo primitivo que es un engrosamiento de células epiblasticas el cual crece por debajo del ectodermo para formar la notocorda [1]. Este es un centro inductor y organizador tanto de mesodermo lateral para inducir la formación de los somitas paraxiales pero también la inducción de las células suprayacentes; el ectodermo, el cual lo inducirá para transformarse en neuroectodermo conocido como la placa neural. Esta inducción primaria se sabe es dada por moléculas que secreta la notocorda, nogina [2], cordina y folistatina [3]. En el ectodermo dorsal, estas moléculas inhiben a la proteína morfogenética osea (BMP-4) y en ausencia de la señal de BMP-4, el tejido ectodermal forma por defecto tejido neural [4]. En algunos animales de evolución más reciente, señales inductoras adicionales pueden ser requeridas como son moléculas del Factor de Crecimiento Fibroblastico (FGF) y moléculas tipo Wnt. Morfológicamente, es notorio el engrosamiento del epitelio, asociado a la formación del neuroepitelio, hay un

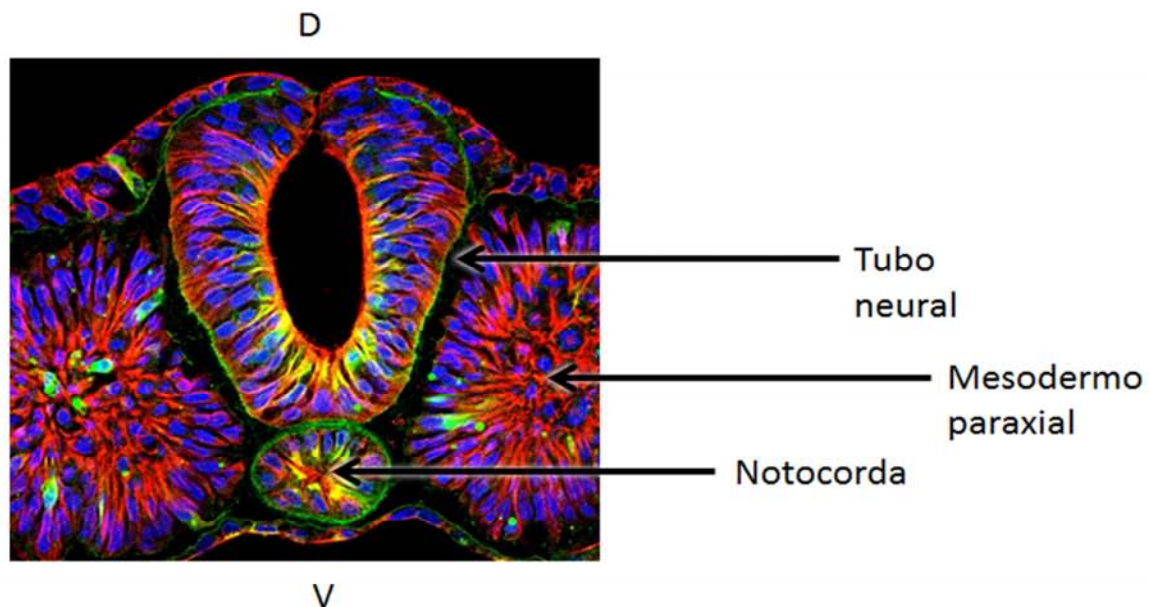


Fig. 2. Corte transversal de un embrión de pollo de 2 días de gestación en el que se muestra de manera central el tubo neural casi completamente cerrado y debajo de él la notocorda, lateral a esto el mesodermo paraxial. En verde se observa la proteína extracelular vitronectina, α -tubulina del citoesqueleto en rojo y en azul los núcleos celulares. Tomado por M Ángeles Ramón del Instituto de Biología Molecular de Barcelona.

estrechamiento en su eje transversal y alargamiento de toda la placa en su eje longitudinal. Posteriormente el plegamiento de esta placa formará el surco neural. Finalmente los ápices de la placa en plegamiento conocidos como cresta neural se separan, el surco se cierra y forma el tubo neural. De las crestas neurales se desarrollarán el sistema nervioso periférico y otros tipos celulares no neurales; a partir del tubo neural se desarrollará todo el sistema nervioso central [5]. A este proceso se le denomina neurulación (Fig. 2).

REGIONALIZACIÓN DEL TUBO NEURAL

El tubo neural a su vez ha de dividirse en segmentos principales, el prosencéfalo, mesencéfalo, romboencéfalo y médula. Alrededor de las tres semanas de desarrollo en los humanos, el prosencéfalo se dobla hacia su región ventral a través de la curvatura cefálica. Una semana más tarde la curvatura cervical dobla aún más el cerebro en desarrollo al nivel de la unión del romboencéfalo con la médula espinal. Posteriormente, el prosencéfalo se subdividirá en telencéfalo para dar origen a la corteza cerebral y el diencefalo que generará una estructura con el mismo nombre en el adulto. El romboencéfalo se subdividirá en metaencéfalo que a su vez formará el puente y el cerebelo; el mielencéfalo a la medula oblonga (Fig. 3) [1].

Conforme el desarrollo continúa, un grupo de genes empieza a expresarse a lo largo del eje anteroposterior, éstos son los genes homeóticos o también llamados Hox [6]. Estos genes están ampliamente conservados en casi todos los animales y permiten una subdivisión aún mayor de los segmentos, no solo corporales en general, sino del sistema nervioso en específico [7].

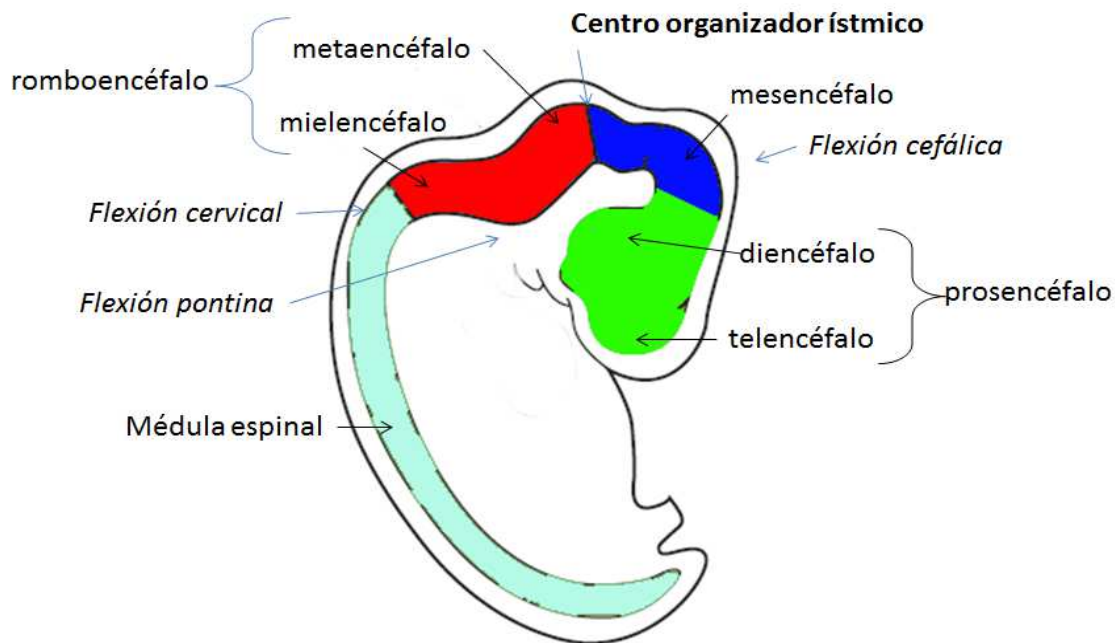


Fig. 3. Corte longitudinal de un embrión donde se observa la regionalización del tubo neural en sus diferentes zonas y subdivisiones.

A su vez el ácido retinoico (AR) es otra molécula que actúa como morfógeno con un gradiente de concentración caudo-cefálico por lo que se considera que su principal efecto es inducir la adquisición de un fenotipo caudal en las células sensibles a AR. Se ha observado que estos efectos pueden ser mediados a través de la activación de los genes Hox [8]. Por ejemplo, los genes Hoxa1 y Hoxb1 poseen en sus promotores elementos de respuesta para AR; estos genes son importantes para la adquisición de la identidad craneocaudal de los rombómeros [9].

En general ahora se sabe de varias señales que regionalizan el sistema nervioso. Algunas que generan una identidad anterior son cordina, noggina y folistatina. Algunas señales caudalizantes como AR, Wnt y BMPs.

El futuro cerebro en desarrollo también tiene que ser segmentado y en etapas tempranas del desarrollo dos genes dividen el cerebro en un eje anteroposterior con dos dominios establecidos por los factores transcripcionales Otx2 y Gbx2. Del punto más anterior hasta la frontera entre el cerebro medio y el cerebro posterior se expresa Otx2; por el contrario de la frontera entre cerebro medio y posterior hasta la región más caudal del encéfalo es expresado GBx2. Ambos territorios son mutuamente excluyentes [10]. Por tanto la expresión de Otx2 es de suma importancia por dos razones; 1) permite que el cerebro medio establezca un territorio para su desarrollo y más importante 2) entre ambos genes, se establece la frontera cerebro medio/posterior o también conocido como organizador ístmico que servirá más adelante como centro organizador de estas regiones (Fig 4).

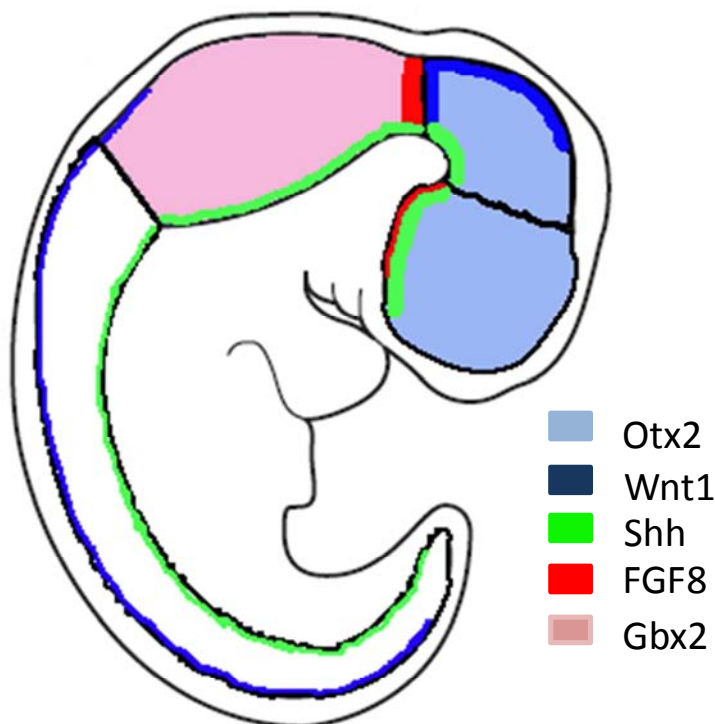


Fig. 4. Corte longitudinal de un embrión donde se observan los factores transcripcionales (Otx2 y Gbx2) así como de algunos morfógenos (Wnt1, Shh y FGF8) conocidos que intervienen en la regionalización del sistema nervioso central.

NDA MESENFÁLICAS

ESPECIFICACIÓN DEL MESENFALO.

Una vez establecido el eje anteroposterior por Otx2 y Gbx2 alrededor de E7, se establece el organizador ístmico donde empiezan a secretarse las proteínas Wingless-type (Wnt1) y Engrailed-1 (En1) para refinar aún más la ontogenia del cerebro medio; pues en E8, la presencia de Wnt1 permite la expresión de Engrailed (En) 1 y 2 [11]. Estos factores permiten la especificación de la futura área donde se desarrollarán las neuronas de la SNpc [12]. Otros factores transcripcionales empiezan a encenderse como son Pax2 y Lmx1b. Lo anterior parece permitir en E8.5 la aparición de una de las moléculas de las cuales se sabe hasta ahora, es de las más importantes para la adquisición del fenotipo dopaminérgico, esta es, el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) [13]. Pax5 es necesario para el orquestamiento exacto en la formación del mesencéfalo. Como se mencionó anteriormente, la formación del organizador ístmico es de suma importancia para el desarrollo del mesencéfalo [14]. Una vez establecido el patrón básico del mesencéfalo ventral, las células de la glía radial del piso del mesencéfalo producen los precursores neurales que darán origen a las neuronas dopaminérgicas de esta región [15].

INDUCCIÓN MOLECULAR DE LAS NDA DEL MESENFALO

El mesencéfalo posee tres núcleos de neuronas dopaminérgicas A8, A9 y A10; núcleo *ruber*, SNpc, y área ventral tegmental (VTA) respectivamente. Todos ellos derivan del piso del mesencéfalo.

La especificación de estas neuronas empieza en E8.5 cuando el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) es inducido a secretarse desde el organizador ístmico por acción de Wnt1 [16]; y de Sonic Hedgehog (SHH) en el eje ventrodorsal. Inicialmente este factor es secretado por la notocorda subyacente pero posteriormente es secretada por la propia placa del piso. Este factor por tanto, permite la adquisición de un fenotipo ventral a lo largo del tubo neural [17].

Se considera que FGF8 actúa generando un gradiente difusible que permite crear un ordenamiento de los precursores neurales que darán origen a los diferentes tipos de NDA [18]. Ya en E9 en la placa de piso, la expresión de SHH induce a su vez la expresión de Lmx1a y los factores Oc 1-3 (aún no completamente caracterizados) y que a su vez permiten la expresión de Msx1 [19, 20]. Es de notar que mientras la expresión de Msx es temporal solo para favorecer la expansión de los precursores neurales, la expresión de Lmx1a es incluso postnatal. En esta cascada de expresión, Lmx1a induce la expresión de Neurogenina 2 (Ngn2) [21] lo que implica la adquisición de un fenotipo neuronal, la salida del ciclo mitótico y la diferenciación neuronal. Aunque Lmx1b se activa inicialmente durante la regionalización del cerebro medio, ahora se sabe que posteriormente ayuda a la especificación y la maduración de las NDAs [22]. El factor transcripcional FoxA2 es otro factor involucrado en la génesis del mesencéfalo y de las NDA de esta región pues junto con SHH establecen una asa de retroalimentación positiva que

permite el mantenimiento de la expresión de estos factores y a su vez la expresión de los factores ya mencionados Lmx1a y Lmx1b [23, 24].

Las proteínas Wnt también han sido analizadas y se ha dilucidado son parte de la compleja red de moléculas que dan origen a las NDA. Wnt1 inicia su expresión en E9.5 rostral al organizador ístmico [25, 26]; se sabe que Wnt permite la proliferación de los precursores y aumenta la diferenciación terminal. La actividad de Wnt1 permite la proliferación al igual que Wnt3a, mientras que Wnt5a la diferenciación terminal. ¿De qué depende la actividad específica en cada una de estas poblaciones? Aún se desconoce.

Muchos de estos factores establecen circuitos regulatorios como en el caso de FGF8 que regula la actividad de beta-catenina (un regulador de la vía canónica de Wnt) y con Lmx1a y Lmx1b funcionan sinérgicamente para modular la proliferación de los precursores neurales de las NDA del mesencéfalo en desarrollo [27]. Wnt1 puede a su vez antagonizar a SHH una vez que se ha creado una cantidad suficiente de precursores y dar paso a la neurogenesis [28]. Por el contrario SHH establece un asa de retroalimentación positiva con FoxA2 (Fig. 5).

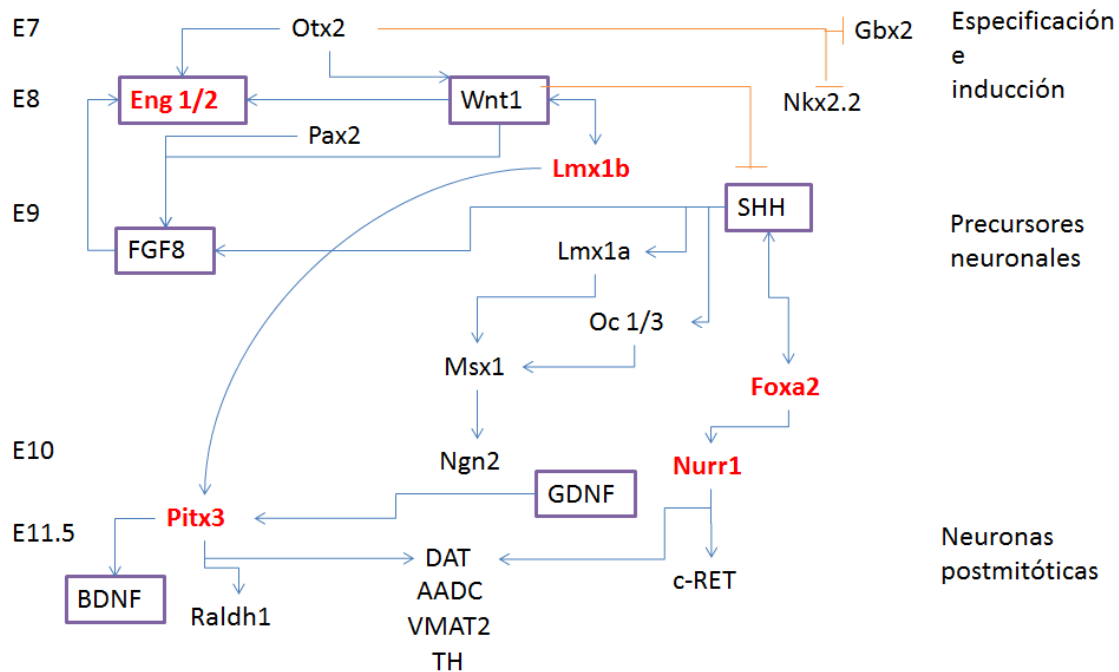


Fig. 5. Esquema de interacciones entre diversos factores conocidos que permiten la especificación de las NDA. A la izquierda se define el estadio en el que estos aparecen, las flechas en azul indican una interacción positiva y las líneas romas en naranja inhibición, en rojo factores transcripcionales que permanecerán activos por el resto de la vida del organismo y en recuadros factores solubles.

DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS NDA

La adquisición de un fenotipo maduro de las NDA comienza cuando los precursores neurales dejan de dividirse lo cual sucede alrededor de E10-14 con un pico en E12 [29], Una de las primeras características es la expresión de factor transcripcional Nurr1 (inducida por FoxA2) que se sabe dirige la expresión de genes asociados a la síntesis, liberación y recaptura de dopamina; la enzima limitante, la tirosina hidroxilasa (TH), la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) el transportador vesicular de monaminas (VMAT) 2 y el transportador de dopamina (DAT). Igualmente importante se sabe que Nurr1 permite la expresión del receptor c-ret para el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el cual es ampliamente conocido por su capacidad para favorecer la supervivencia de las NDA, por lo que indirectamente Nurr1 participa en los mecanismos de supervivencia de las NDA postmitóticas. GDNF se expresa durante la especificación de las NDA lo cual indica su papel importante durante el desarrollo de estas neuronas [30].

Un segundo proceso es que estas neuronas recién salidas del ciclo celular tienen que buscar su sitio final en el cerebro en formación mediante una migración celular; primero, en dirección ventral y después tangencialmente rumbo a su destino final lo cual empieza alrededor de E11.5; en este momento empiezan a expresar el factor transcripcional Pitx3. Las NDA correspondientes a la SNpc expresan Pitx3 antes que TH mientras que las de la VTA lo hacen inversamente o simultáneamente [31]. Un factor asociado a la supervivencia es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) mismo que es inducido por la expresión de Pitx3 por lo que se sabe que permite la adquisición de un fenotipo dopaminérgico al inducir TH, DAT y VMAT2 al coadyuvar con Nurr1 para inducir la expresión de TH sino que también permite la supervivencia de las NDA al favorecer la expresión de factores tróficos. El AR puede estar jugando un papel importante en la diferenciación dopaminérgica aunque su efecto no es del todo claro, pues Pitx3 regula la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa (Raldh1) que convierte el retinaldehído en AR [32].

Ya durante el resto de la vida de las NDA factores transcripcionales como FoxA2, Lmx1b, En-1/2, Nurr1 y Pitx3 permanecerán activos para mantener el fenotipo dopaminérgico y promover continuamente la supervivencia de estas células. Otx2 solo permanecerá activo en las neuronas de la VTA [33].

CONECTIVIDAD NIGRO-ESTRIATAL

Una vez que los somas de las NDA se posicionan en su capa definitiva (alrededor de E11.5 en el ratón) señales inductivas promueven el crecimiento de sus axones rumbo a la región dorsal del estriado. Este crecimiento axonal dirigido está mediado por moléculas como Ephrinas y sus receptores Eph; Netrinas y sus receptores DCC; así como por Slit1 y Slit2 [21].

Si las neuronas fallan en establecer dichas conexiones o son aberrantes, estas neuronas mueren por apoptosis en el periodo postnatal inmediato y un segundo pico de muerte a las dos semanas postnatales.

DESARROLLO DE LAS MNs ESPINALES

La capacidad de movimiento de los vertebrados reside en la habilidad de contracción muscular orquestada en última instancia por las neuronas motoras de los pares craneales y espinales.

Durante el establecimiento del tubo neural y la especificación de la zona ventral de la médula espinal dos moléculas son de suma importancia. Como ya se mencionó antes, SHH permite la ventralización del tubo neural, lugar de origen de las MN. Segundo, la secreción de ácido retinoico a partir de las somitas paraxiales inicialmente [34] y ya en E11-12 por el propio tubo neural [35] permite la caudalización del tubo neural actuando desde el cerebro posterior y toda la médula espinal. Lo anterior permite una intrincada y precisa interacción entre

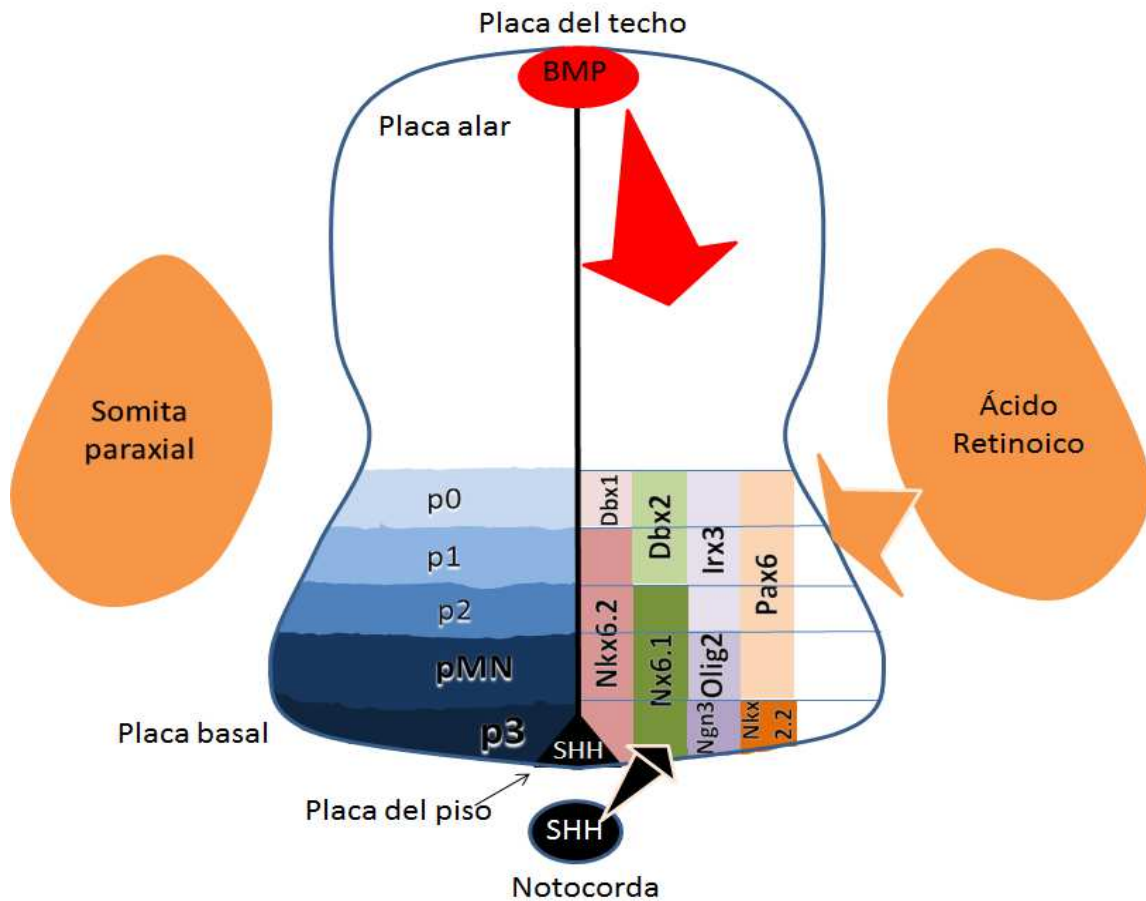


Fig. 6. Esquema representativo de un corte transversal del tubo neural, somitas paraxiales y notocorda a nivel de médula espinal en donde se observa las zonas de diferenciación neuronal en la parte ventral del tubo neural, el arreglo de factores correspondientes a cada una de estas regiones y los factores extrínsecos que intervienen para la diferenciación en la zona pMN que dará origen a las MN.

factores transcripcionales que especificarán las neuronas del tubo ventral. Este juego de morfógenos permite crear patrones específicos dorso-ventrales para cada uno de los grupos neuronales V0-V3 y MN. En el caso de las MN se ha dilucidado que la adquisición del linaje correspondiente se da durante etapas proliferantes de los precursores de las MN (pMN); los factores involucrados en ello y que actualmente se conocen son: Pax6, Olig2, Nkx6.1 y Nkx6.2 [36]. De todos los anteriores, Olig2 es el único factor que se expresa exclusivamente en el dominio de pMN (Fig. 6) [37].

REGIONALIZACIÓN DE LAS MNs

En el eje rostro-caudal igualmente se ha de crear una diferenciación fenotípica para el control diferencial de los diversos grupos musculares. Una mayor

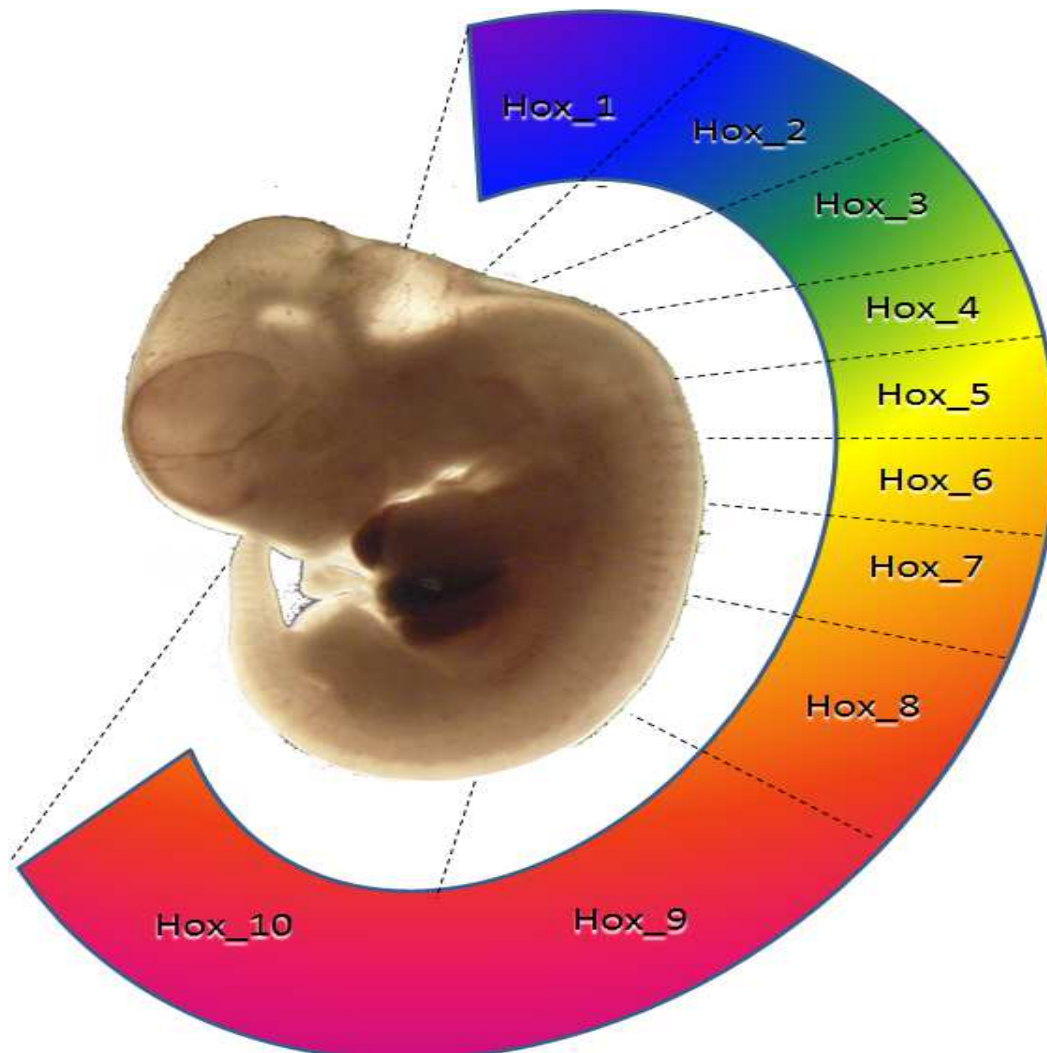


Fig. 7. La familia de los genes Hox controla la segmentación del tubo neural y el resto del cuerpo a través de la expresión diferencial y secuencial de distintos genes de esta familia, en el esquema, se encuentran representados algunos de ellos; mismos que intervienen en la diferenciación neuronal

expresión de ácido retinoico permite inducir la anteriorización fenotípica de los pMN mientras que una baja de AR y un incremento en los morfógenos Gdf11 y FGF8 induce una caudalización. Durante este proceso y como en el resto del patrón corporal los genes homeóticos Hox juegan un papel importante en dicha regionalización. Los primeros genes Hox se han de expresar cefálicamente y los últimos caudalmente por lo que a nivel cervical se puede encontrar la expresión de Hoxc4 y Hox5; a nivel braquial Hox6 y Hoxc8; a nivel torácico Hox9; y a nivel lumbar Hoxd9, Hox10 y Hox11 [38-40](Fig. 7).

MADURACIÓN DE LAS MNS

Al salir del ciclo celular, las MN adquieren características definitorias de esta estirpe neuronal. Durante el desarrollo, los factores transcripcionales HB9 y Isl1 (Isl1) son expresados, sin embargo durante la especificación fenotípica de cada columna de motoneuronas, algunas podrán continuar expresando ambos marcadores, otras sólo Isl1, y otras más sólo HB9; sin embargo, una característica de todas las MN es que poseen alguno de estos factores transcripcionales activos [41]. Otras proteínas asociadas a la actividad colinérgica característica de estas neuronas y que aparecen posteriormente son la colin-acetil transferasa (ChAT) que permite la síntesis de Acetil colina y el transportador vesicular de Acetilcolina (vAChT).

En la médula espinal, las MNs se encuentran agrupadas en columnas que inervan músculos específicos; éstas columnas poseen códigos transcripcionales específicos para cada columna (Fig. 8). La columna motora media (MMC) inerva músculos axiales; la columna motora hipaxial (HMC) inerva musculatura abdominal; la columna preganglionar (PGC) inerva el sistema visceral autónomo y por último la columna motora lateral (LMC) que inerva la musculatura de las extremidades [42]. Aunque en etapas de precursores, todas las células expresan el factor Lim, Lhx3 este se restringe a las MMC y parcialmente en las HMC, que a su vez vuelve insensibles a estas MNs a los efectos regionalizadores de los genes Hox. Contrariamente el factor FoxP1 se expresa en las LMC y PGC y vuelve sensibles a estas MN a los efectos de los genes Hox [5] [42] (Fig. 8).

Las MNs también deben madurar funcionalmente para poder transmitir adecuadamente los impulsos nerviosos hasta sus terminales. Deben ser capaces de responder a GABA, glicina y glutamato mediante incrementos de corriente; en cultivo pueden desarrollar circuitos y generar actividad espontánea, potenciales acción (AP) evocados, y movilización de calcio al ser estimulados con kainato. Morfológicamente los registros adquieren características típicas como son adaptación de la frecuencia de espigas (SFA), corrientes I-H tipo sag y potenciales de acción de rebote (RAP). Además, cambios en las propiedades pasivas de la membrana como son potencial de membrana en reposo (MRP) y la resistencia de membrana [43, 44].

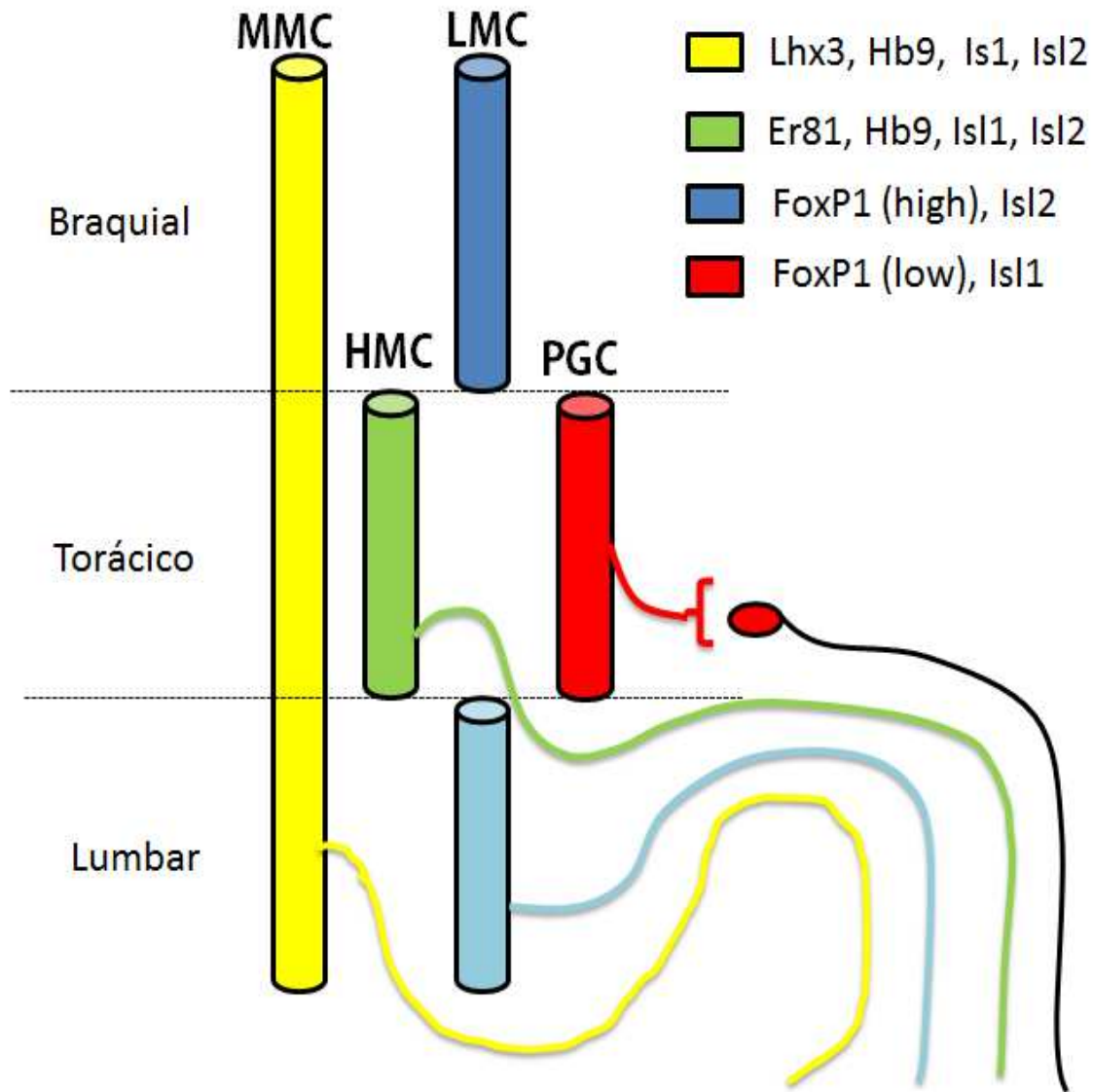


Fig. 8. Factores transcripcionales que se expresan en las diferentes columnas motoras. MMC, columna motora medial; LMC, Columna motora lateral; HMC columna motora hipaxial; PGC, Columna preganglionar

INDUCCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MNs POR FACTORES TRÓFICOS

Desde el descubrimiento del factor de crecimiento neural (NGF) por Rita Levi-Montalcini se empezó a gestar la teoría de la competencia por factores tróficos donde aquellas neuronas que no recibían dichas señales debido a su escasez relativa morían mientras que las que lograban obtenerlo, sobrevivían y maduraban. Desde esa primera visión, ahora se conocen múltiples factores que pueden ser partícipes. Para agregar mayor complejidad a este panorama, no todas las MN son dependientes de los mismos factores. Uno de los factores más estudiados es el GDNF que en las MNs su primer efecto descrito fue favorecer la supervivencia de estas neuronas [45]. Posterior a ello, otros efectos se han

descrito para este factor y no solo asociado a la inducción de la sobrevivencia; estos efectos se asocian a la fuente de GDNF; por ejemplo, cuando aparecen las primeras neuronas postmitóticas alrededor de E10, las MNs están listas para emitir sus axones, al mismo tiempo un grupo de células mesenquimales en el primordio de las extremidades secreta GDNF para dirigir los axones de las MN hacia la futura extremidad [45, 46]. Ya en E12, la expresión de GDNF se restringe a algunos grupos musculares principalmente dorsales. Finalmente en E15 GDNF es expresado únicamente por las fibras intrafusales del músculo esquelético y solo las γ -MN son responsivas a él. La señalización por GDNF induce la expresión de PEA3 que a su vez induce Sema3E, una semaforina repelente para las neuronas que expresan el receptor PlexinaD1 el cual está expresado en todas las neuronas propioceptivas con sus aferencias tipo Ia [42]. Lo anterior demuestra los diferentes efectos que posee GDNF durante el desarrollo.

CÉLULAS TRONCALES

DEFINICIÓN

Las células troncales son células que poseen dos capacidades *sin equa non*, las cuales son diferenciación y autorrenovación [47]. La primera cualidad hace referencia a que estas células que se encuentran en un estado “inmaduro” pueden especializarse en células terminalmente diferenciadas; tanto en el animal adulto como durante su etapa de desarrollo. La segunda cualidad reside en el hecho que en cada diferenciación la poza de células troncales se agotaría y gradualmente desaparecería; para ello, las células troncales deben replicarse donde por lo menos una de las dos células hijas debe mantener estas dos mismas características, autorrenovación y capacidad de diferenciación (Fig. 9).

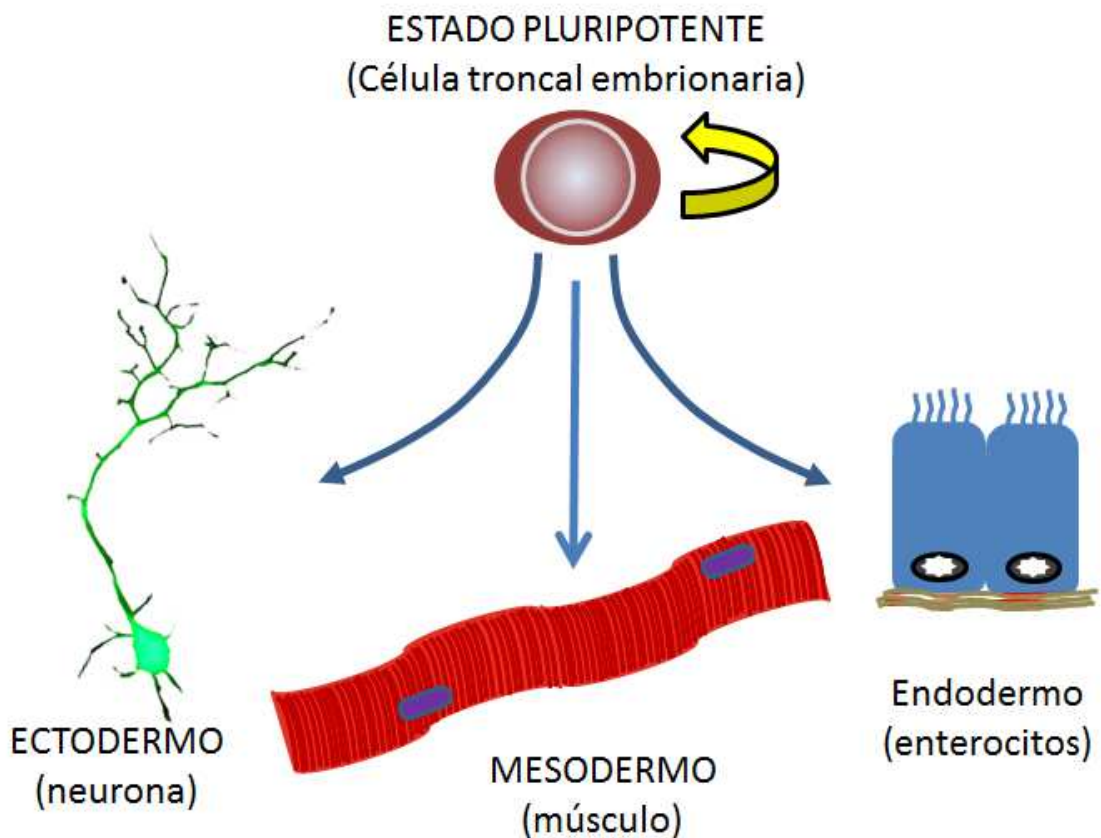


Fig. 9. Las células troncales pluripotenciales como son las troncales embrionarias son capaces de generar todos los tejidos de las tres capas embrionarias; en este esquema ejemplificado se encuentra una neurona, músculo esquelético y enterocitos.

HISTORIA DE LAS CÉLULAS TRONCALES

El término “troncalidad” fue utilizado por primera vez en 1868 por el biólogo Ernst Haeckel al describir el estado en el que se encontraba un huevo fertilizado y su capacidad para convertirse en un organismo completo [48]. Ya en el siglo XX Alexander Maximov sugiere un origen troncal en el linaje sanguíneo y por tanto acercándose aún más al concepto actual de troncalidad al definir a un ancestro general de las células sanguíneas como célula troncal sanguínea que dará origen al componente celular de la sangre.

Cincuenta años pasaron para que Leroy Stevens descubriera que teratomas en ratones son capaces de generar tejidos de las tres capas embrionarias lo que llevo a aislar células de “carcinoma embrionario y que derivaría en la primer línea de células troncales pluripotenciales, las células troncales de carcinoma [49]. Ya en los 60's del siglo anterior, Ernest McCulloch descubre que los diferentes tipos de células sanguíneas derivan de grupos especiales de células troncales, convirtiéndose en un parteaguas en cuanto a el reconocimiento de la existencia de un proceso de diferenciación, hoy estas células son conocidas como células troncales hematopoyéticas. Muchos investigadores por estos tiempos intentaron realizar trasplantes de médula ósea para tratar enfermedades sanguíneas como la leucemia. Curioso también notar que pese a que el trabajo en el área de hematopoyesis y trasplante celular es el más sólido hasta este momento, en aquel entonces el campo de las células troncales se encontraba tan mal definido en esos tiempos, que no era conocido como investigación en células troncales.

Brigs and King en 1952 desarrollan una técnica para trasplantar el núcleo de un célula en etapa de blástula en un huevo enucleado de Rana; lo anterior le permitió a John B. Gurdon demostrar que el núcleo de una célula completamente especializada como son las células del intestino al ser trasplantada en un huevo enucleado de *Xenopus laevis* podía desarrollarse por completo [50] convirtiendo así a una célula terminalmente diferenciada nuevamente en totipotencial; es decir, con la capacidad de generar a un organismo completo incluido todos los tejidos extraembrionarios de soporte. Sus experimentos le permitieron obtener el premio Nobel de medicina y a otros investigadores realizar los experimentos que en 1997 permitirían la clonación del primer mamífero, la famosa Oveja Dolly [51] (Fig. 10) y del primer ratón en 1998 [52].

Conforme el terreno de las células troncales se definía, y la biología del desarrollo entendía los procesos iniciales durante el desarrollo del blastocisto, en el que el estado pluripotencial de estas células es transitorio; la obtención de una línea celular que poseyera las capacidades de pluripotencia de manera estable fue una meta anhelada. En 1981, Martin Evans y colaboradores obtuvieron blastocistos de ratón, de ellos extrajeron la masa celular interna y la cultivaron *in vitro* sobre células alimentadoras estromales conocidas como STO; de esta forma, lograron aislar la primer línea celular de células troncales embrionarias de ratón sin alteraciones cromosómicas o genéticas (a diferencia de las células de teratocarcinoma) con capacidades de pluripotencia [53]. Más adelante, otras líneas celulares similares a ESC serían creadas como las germinales embrionarias derivadas de las células germinales primordiales obtenidas de las gónadas en desarrollo [54]. Pese a que las ESC de ratón aportaban mucha información *in vitro* de fenómenos del desarrollo en etapas tempranas que hasta el momento habían

permanecido teóricos; era necesario generar ESC humanas. En 1998, Thomson y colaboradores fueron capaces de obtener ESC humanas a partir de embriones humanos usados para fertilización *in vitro* y que serían descartados. Estas células se comportaban de manera similar a su contraparte humana; sin embargo a diferencia de las ESC de ratón que necesitan del factor inhibidor de la leucemia (LIF) para mantener su estado pluripotencial, las ESC humanas dependen del FGF básico [55].

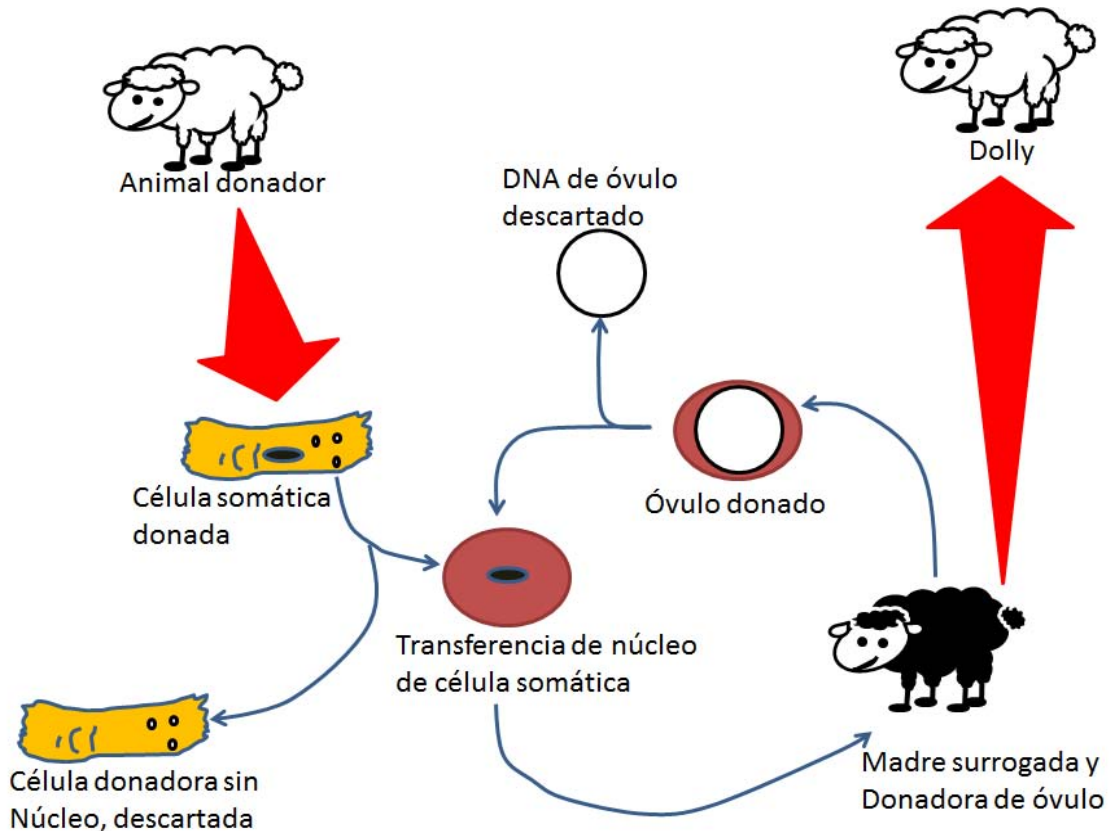


Fig. 10. Transferencia nuclear para la generación de un animal completo a partir de una célula adulta. Primero se obtienen células de algún animal donador, generalmente fibroblastos, se extrae el núcleo y se desecha el resto celular; paralelamente se obtiene un ovocito sin fertilizar y se retira el material genético, a este ovocito enucleado se le inserta el núcleo donador y se activa para poder reiniciar el desarrollo. Finalmente se inserta en una madre receptora para que el organismo se desarrolle a término.

Aunque anteriormente la técnica de transferencia nuclear había sido exitosa (pese a su baja eficiencia) en el sapo y algunos otros animales, se desconocían los factores que se encontraban en el oovoplasma y que son responsables de tal transformación. En 2006 Takahashi y Yamanaka realizaron un tamizaje de varios factores transcripcionales que ellos consideraron estarían involucrados en la adquisición de un estado pluripotencial; 4 de ellos (Oct4, Sox2, klf4 y c-myc) resultaron capaces de revertir fibroblastos de ratón en células parecidas a las ESC con un estado pluripotencial [56] conocidas como células pluripotenciales

inducidas (iPSC) (Fig. 11). Esto, permitió superar barreras legales, éticas y de inmunorrechazo en caso de trasplante autólogo. La técnica de transferencia nuclear había sido incapaz de realizarse exitosamente en células humanas y aunque en 2005 Woo Suk Hwang declaró haber realizado finalmente dicha transferencia en humanos; más tarde se demostró que había sido un fraude y no fue sino hasta el 2013 en que Tachibana y Mitalipov lograron derivar ESC a partir de transferencia nuclear [57]. El campo de las células troncales se encuentra en su momento más productivo debido a que ofrece la posibilidad de generar cualquier tipo de célula dañada o perdida en un individuo adulto; sin embargo, los

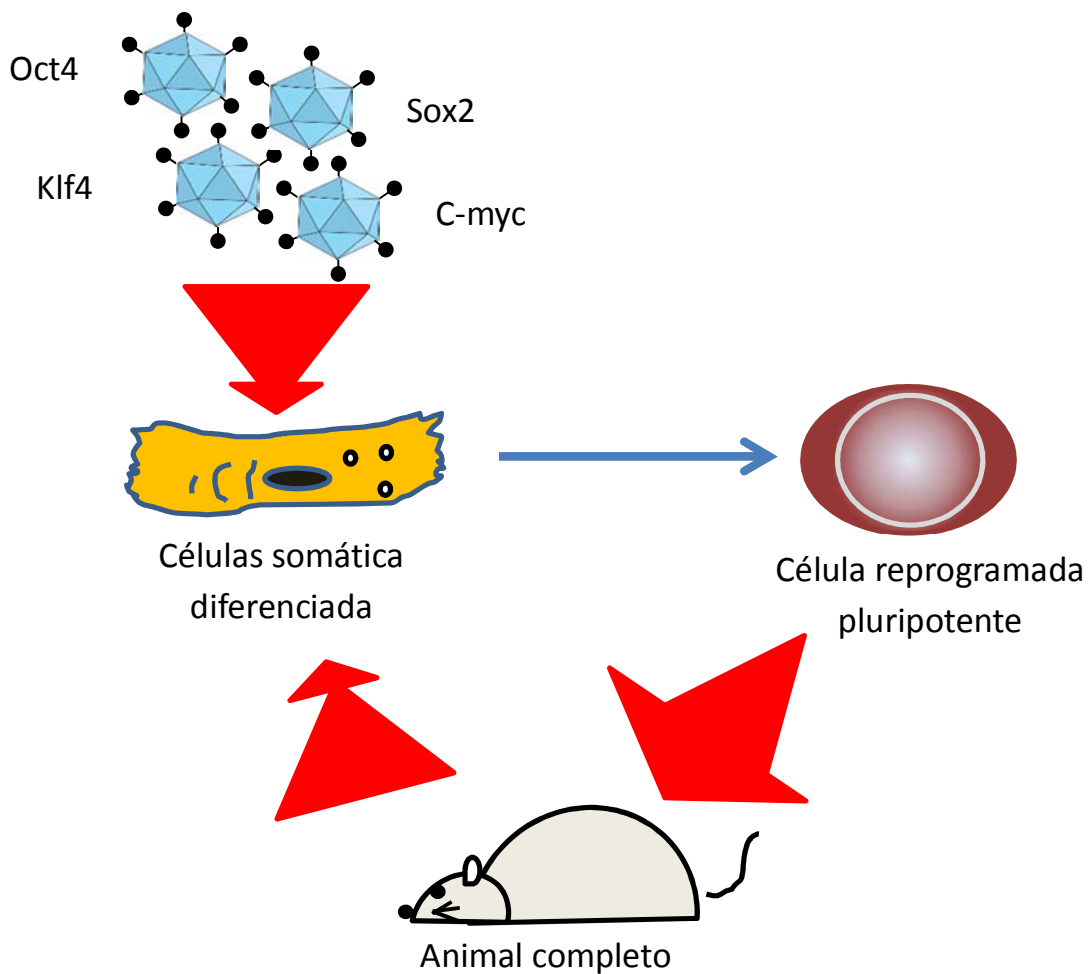


Fig. 11. Generación de células pluripotenciales inducidas. Se recuperan células de un animal adulto, generalmente fibroblastos, y se agregan por diferentes métodos (inicialmente retrovirus) factores transcripcionales que reestructuran el fenotipo celular a un estado pluripotencial, una vez establecidas como células troncales pluripotenciales estas pueden generar un animal completo nuevamente

mecanismos que llevan a adquirir un fenotipo completamente diferenciado y por sobretodo perfectamente funcional, apenas han empezado a dilucidarse.

CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (ESC)

Las ESC son células con una alta tasa metabólica, una relación núcleo/citoplasma grande. Cuando se crecen sobre células alimentadoras, las ESC de ratón crecen como colonias compactas, en domo, de bordes bien definidos y las células son indistinguibles una de otra. En el caso de las humanas, las colonias suelen ser más aplanadas y de bordes irregulares. Otra diferencia notable es la dependencia de señales para la manutención del estado indiferenciado, las de ratón necesitan BMP4 y LIF [58]; las de humano, FGF2 [55]. Actualmente se reconoce que estas diferencias en las vías de señalización más que deberse a diferencias interespecie, puede deberse a estadios de diferenciación; uno *ingenuo* (dependiente de LIF) más primitivo y un estado pluripotencial preparado o cebado para el inicio de la diferenciación [59]

Ahora se conoce que las ESC para mantener su estado pluripotente deben tener activos varios factores transcripcionales; algunos de ellos son Oct4, Sox2, Klf4, c-myc, Nanog, Lin28, Nr5a2, Esrrb, Rex1, Sall4, Fbxo15 y algunos marcadores de superficie como son SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60 y TRA 1-81 así como expresar la fosfatasa alcalina tipo placentaria [60].

Si estas células se dejan diferenciar espontáneamente *in vitro* son capaces de formar varios tipos de células especializadas, epitelios, células mesenquimatosas, arreglos glandulares, etc; es decir, células de cualquiera de las tres capas embrionarias. Un ensayo similar *in vivo* es la formación de teratomas; ESC son inyectadas en ratones inmunocomprometidos para evitar el rechazo de las células y estas puedan crecer y formar un tumor macroscópico. Similar a la diferenciación espontánea, las ESC deben dar origen a tejidos de las tres capas embrionarias (Fig. 9). La diferenciación obtenida mediante estos métodos es desarreglada y aleatoria, por lo que ensayos más apegados al desarrollo normal se han establecido. Uno de ellos es la formación de quimeras; este permite evaluar si las ESC responden a las señales espacio-temporales existentes durante el desarrollo. Para ello se inyectan ESC en un blastocisto en desarrollo y se permite se lleve a término, las ESC deben ser capaces de integrarse, ser parte de varios tejidos incluyendo la línea germinal y la descendencia ser fértil.

El estudio que se considera la prueba máxima de pluripotencia es la capacidad de formar un individuo completo y fértil; esto es, las ESC se co-implantan con células con cariotipo tetraploide en el útero de una madre subrogada. La aberración cromosómica les impide ser parte de algún tejido embrionario; sin embargo, generan eficazmente tejido extraembrionario dando soporte a las ESC para desarrollar completamente a un organismo, esto debe incluir la línea germinal y ser fértiles.

El estado pluripotencial es un estado dinámico del cual se conocen suficientes particularidades para poder describirlo; sin embargo hay otras muchas características que siguen siendo estudiadas.

OTRAS CÉLULAS TRONCALES

Pese a que todas las células troncales deben poder autorrenovarse y diferenciarse a células maduras, las células troncales pueden variar en su potencial de diferenciación o en su origen. Una célula totipotencial es aquella que puede generar a un individuo completo incluyendo todos los tejidos extraembrionarios y solo existen después de la fecundación y hasta una mórula de 8 células. Artificialmente, estas células pueden ser generadas al transferir el núcleo de una célula madura e insertarlo en un ovocito que a su vez se le ha retirado su propio material genético. Por otra parte, y como ya se mencionó, una célula pluripotencial puede diferenciarse en un individuo completo excepto tejidos extraembrionarios. Las células de carcinoma embrionario, las ESC, las células troncales germinales y las iPSC son ejemplos de ellas. Existen también las células troncales del epiblasto similares a las ESC pero con algunas diferencias [61].

Durante el desarrollo estas células restringen su potencialidad y solo darán origen a diferentes estirpes dentro de una misma capa embrionaria (ectodermo, mesodermo o endodermo). Conforme el individuo se desarrolla, las células pueden adquirir un estado de potencialidad restringido y dar origen solo a células dentro del tejido en el que se encuentra. Por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas dan origen a todas las células en el sistema circulatorio. Las células troncales epiteliales a los queratinocitos y sus anexos; muchos otros tipos de células troncales residen a lo largo de un organismo convirtiéndose en tejido-específicas o linaje-específicas. En el sistema nervioso, incluso en el adulto, se genera glía y neuronas nuevas derivadas de las células troncales neurales; sin embargo, esta neurogénesis adulta está restringida a la zona subventricular y a la zona subgranular del giro dentado del hipocampo [62]. Lo anterior hace al sistema nervioso un tejido con capacidades regenerativas muy limitadas, ya que estas zonas neurogénicas solo producen neuronas involucradas en la percepción olfatoria, aprendizaje y memoria (Fig. 12). Otros linajes neuronales no se regeneran en la adultez en los mamíferos. Su limitada accesibilidad complica aún más el estudio de estas células. Por lo anterior, otros modelos o fuentes como son las ESC o iPSC se han usado preferentemente para estudiar el desarrollo del sistema nervioso, el uso de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurológicas, o incluso, terapia génica o celular experimental.

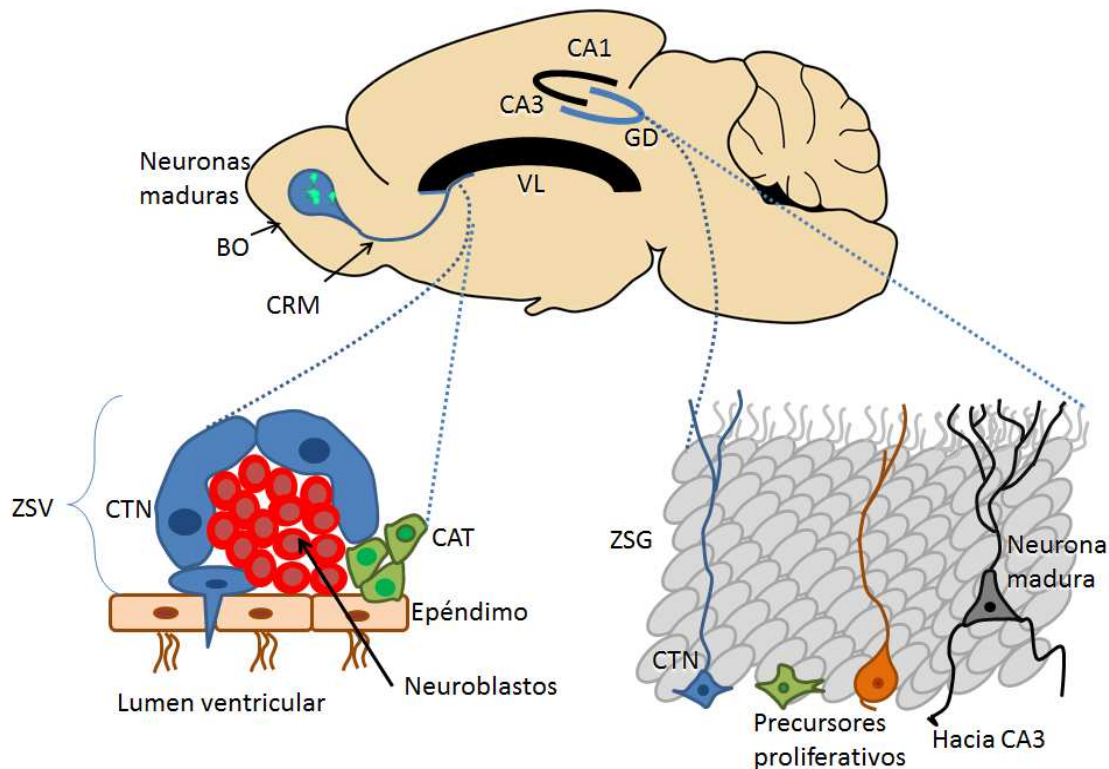


Fig. 12. Neurogénesis en el adulto. Esquema representativo que muestra la generación de nuevas neuronas en el cerebro de ratón adulto en dos áreas específicas. En la ZSV las CTN son células quiescentes que generan CATs que son de división rápida para finalmente generar neuroblastos que migrarán a lo largo de la CRM para llegar al bulbo olfatorio e integrarse en el circuito local. En la ZSG las CTN poseen un proceso que se extiende a lo largo de la capa subgranular; estas células dan origen a los precursores proliferativos que finalmente generan neuronas que migran a la zona granular y conectan hacia CA3. BO, bulbo olfatorio; CRM, corriente rostral migratoria; VL, ventrículo lateral; GD, giro dentado; ZSV, zona subventricular; CTN, células troncales neurales; CAT, células de amplificación transitoria; ZSG, zona subgranular.

UTILIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales al poseer una gran maleabilidad y plasticidad celular se han convertido en herramientas de aprendizaje y potencial uso como terapia. Este tipo de células ha servido como modelo en biología del desarrollo para estudiar fenómenos que antes resultaba casi imposibles de abordar, principalmente en etapas iniciales postfecundación; en otros casos, ha permitido aislar procesos como son la especificación celular, la muerte programada, o fenómenos de proliferación y diferenciación terminal.

Una vez que se han obtenido células especializadas y dependiendo del objetivo de estudio se puede prescindir de la colecta de material biológico a veces tedioso o complicado, de cultivos primarios o de la necesidad de realizar análisis

comparativo en otras especies debido a la falta de accesibilidad de material humano ya sea por razones éticas, técnicas, biológicas o económicas.

De manera similar la diferenciación dirigida de las ESC sirve para realizar pruebas farmacodinámicas a gran escala y a bajo costo; sin la necesidad de probarlos desde un inicio en animales de experimentación.

Otra gran aplicación de estas células es su uso como vectores para la administración de moléculas con actividad biológica debido a su gran capacidad de integrarse al tejido hospedero, evitando así, la aplicación constante de dicha sustancia o mediante el uso de dispositivos no biológicos como bombas de infusión. Finalmente y el gran objetivo de la investigación en células troncales ha sido la posibilidad y en algunos casos ya realidad de trasplantar estas células en tejidos que necesitan ser reemplazados. Esto se ha realizado exitosamente en algunos tipos de cáncer como en la leucemia donde se genera ablación de la médula ósea enferma y se trasplantan células troncales hematopoyéticas extraídas de la médula ósea de alguno donador inmunocompatible. Poco a poco, al entender los mecanismos de diferenciación, sobrevivencia e integración en los tejidos donde se desea trasplantar nos acercan a la terapia celular como una opción viable y rutinaria; sin embargo, debido a la complejidad diferente de todos los aparatos y sistemas de un organismo y al entendimiento actual de las diferentes enfermedades hacen que el avance en diferentes áreas de estudio sea extremadamente heterogéneo, en algunos casos ya en pruebas clínicas y en otros, aún sin posibilidades reales de resolver la patología en específico estudiada.

CÉLULAS TRONCALES Y EL SISTEMA NERVIOSO

Las células troncales han sido ampliamente usadas para estudiar varios procesos del sistema nervioso: desarrollo, inducción, especificación, maduración, electrofisiología, muerte neuronal, sobrevivencia, etiología de patologías neurodegenerativas, posibles curas, entre otros. Para ello, células troncales de diferentes tipos se han usado, mesenquimales, embrionarias, iPSC así como neurales, inclusive se ha logrado obtener neuronas diferenciadas a partir de otros tejidos adultos como fibroblastos directamente sin el paso regresivo de un estado indiferenciado como podría ser el pluripotencial; a esto se le ha denominado reprogramación directa [63].

NEURODESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN NEURAL

Mediante el uso de células troncales, se han hecho intentos por generar órganos completos *in vitro* y el cerebro no ha sido la excepción; este es el órgano que más nos distingue de todos los demás animales y la generación de un cerebro humano permitirá estudiar esas diferencias donde otros modelos animales poseen limitaciones para entender el nuestro. Recientemente Lancaster y colaboradores desarrollaron un biorreactor para generar lo que denominaron “organoides cerebrales” a partir de células pluripotenciales humanas. Aunque el organoide cerebral obtenido es bastante minúsculo y parte de la limitación en su crecimiento reside en la falta de aporte sanguíneo, es suficientemente desarrollado para detectar estructuras en crecimiento como son la corteza cerebral, el telencéfalo

ventral, y el plexo coroideo entre otros. Además, estos organoides son viables hasta por un año por lo que estudios prolongados son factibles [64].

Durante ya varios años, se ha estudiado la adquisición del destino neuronal, en específico el de las neuronas dopaminérgicas de cerebro medio usando como modelo a las células troncales pluripotenciales y estudiando los mecanismos que guían a estas células para adquirir dicho fenotipo. Ahora se conoce que en precursores neurales derivados de ESC, SHH induce la ventralización de estos precursores. Aunado a ello, la señal del FGF-8 es un segundo organizador que normalmente se libera a partir del istmo y que ayuda a adquirir el fenotipo de cerebro medio. Wnt1 es otra molécula que determina el fenotipo dopaminérgico, FGF-8 parece inducir la expresión de este coadyuvando así a diferenciación dopaminérgica de cerebro medio [65, 66]. La adquisición de un fenotipo final va asociada a la expresión de factores transcripcionales que van dirigiendo y orquestando la especificación celular. Dado que la diferenciación dopaminérgica (y de cualquier otro tipo) difícilmente es 100% eficaz *in vitro*; la sobreexpresión forzada de factores que ahora se sabe confieren dicho fenotipo ha sido estudiada en las ESC. La sobreexpresión de Nurr1 en las ESC permite obtener un mayor número de neuronas Tirosina Hidroxilasa positivas (TH+), enzima limitante en la síntesis de dopamina y que permite identificar el fenotipo dopaminérgico [67]. La sobreexpresión de otros factores importantes en la diferenciación dopaminérgica han sido estudiados como son Lmx1a, Msx1, Ngn2, y Pitx3 en algunos casos similares y en otros contradictorios [68, 69]

La diferenciación a motoneuronas (MNs) espinales también ha sido estudiada. El patrón básico de inducción a este fenotipo requiere de la señalización de Shh para ventralizar a los precursores neurales y de ácido retinoico para la caudalizarlos [70]; sin embargo, el fenotipo de estas neuronas es tan amplio como amplio son los tipos de miocitos presentes en un organismo y el protocolo de diferenciación normalmente usado genera predominantemente MNs de la columna motora medial, estas son neuronas que inervan los músculos axiales. Recientemente Adams reportó que ESC que sobreexpresan el factor transcripcional FoxP1 en neuronas jóvenes postmitóticas y aun en el mismo protocolo de diferenciación, adquieren un fenotipo de columna motora lateral, la cual inerva músculos de las extremidades [71]. Las ESC por tanto han ayudado a generar un mapa de destinos celulares sin necesidad de recurrir a animales transgénicos.

PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS

Las células troncales pluripotenciales también han sido utilizadas para modelar algunas patologías. Con la aparición de las iPSC, y debido a que generarlas es relativamente sencillo, se han usado para la modelación de enfermedades neurodegenerativas que se sabe, poseen un componente genético, muchos investigadores han optado por obtener fibroblastos dérmicos de estos individuos y generar iPSC para posteriormente diferenciarlos a las células neurales que se ven afectadas; y de este modo, estudiar los mecanismos fisiopatológicos envueltos en dicha enfermedad y o generar posibles estrategias terapéuticas.

Enfermedad de Parkinson (EP)

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda más común entre las enfermedades neurodegenerativas, solo después de la enfermedad de Alzheimer. La EP se caracteriza por una pérdida continua e irreversible de las NDA en la *substantia nigra* que inervan al cuerpo estriado, manifestándose principalmente por bradicinesia, temblores y rigidez muscular. Se considera una enfermedad multifactorial y solo en el 10% se ha logrado establecer una causa genética exacta. Una de ellas es la mutación en el gen *SNCA* que codifica para la alfa-sinucleína, se ha identificado que tripletes de este gene desencadenan la enfermedad. Al diferenciar neuronas a partir de iPSC de estos pacientes, las NDA recapitulan la enfermedad al generar el doble de alfa-sinucleína que una célula normal y por tanto pueden ser usadas como un modelo de estudio para la EP [72]. Por otro lado, una posibilidad terapéutica es el implante de NDAs para reestablecer los niveles de dopamina; en este caso, las células pluripotenciales diferenciadas a NDA son una gran opción. En modelos animales, al implantar NDA en la SNpc y dirigir los axones al estriado, su sitio normal de proyección, se ha observado integración de estas neuronas en el hospedero y aún más importante, mejoría conductual [73]; sin embargo, resultados en pacientes han sido contradictorios [74].

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La ELA se caracteriza por una pérdida selectiva de MNs de la médula espinal, lo que genera alteraciones en la locomoción y finalmente la muerte. La etiología suele considerarse multifactorial; sin embargo, el 10% de los casos se asocian a mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa. Recientemente se han descubierto dos nuevas mutaciones con una alta prevalencia en pacientes afectados por esta enfermedad, estas son, *TARDBP* [75] y *C9ORF72* [76]. Devlin y colaboradores recientemente desarrollaron MNs derivadas de iPSC de pacientes que poseen estas mutaciones. Este modelo *in vitro* les permitió observar que estas MNs alteradas poseen un decremento paulatino de la expresión de canales de sodio y potasio dependientes de voltaje lo que traduce en una hiperexcitabilidad inicial seguido de una incapacidad de generar potenciales de acción y actividad sináptica espontánea [77]. Se han realizado abordajes terapéuticos en modelos murinos de la ELA al trasplantar en la médula espinal de estos animales, MNs derivadas de ESC. Aunque una recuperación parcial se observa, los animales terminan muriendo lo cual indica que existe un ambiente tóxico para las MNs en general [78].

Como es notorio, las neurociencias se han nutrido ampliamente de los conocimientos aportados a partir de la accesibilidad de células tipo específicas derivadas de las células pluripotenciales que se han logrado obtener en recientes años, convirtiendo a las células troncales en un objeto de estudio y una herramienta a la vez.

FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE LA GLÍA (GDNF)

Desde el descubrimiento inicial del NGF y el acuñamiento de la así llamada “teoría trófica” muchos otros factores han sido descubiertos, con blancos neuronales específicos, etapas ontogenéticas determinadas y actividades diversas.

Uno de ellos es el GDNF que fue purificado a partir de células de glioma y que permitía la sobrevivencia de NDA en cultivo, un aumento en el tamaño del soma, el crecimiento neurítico y la captación de dopamina [79]. A partir de esa descripción inicial, ha aumentado tanto el número de efectos como las neuronas que son responsivas a dicho factor.

ESTRUCTURA

Este factor es una proteína homodimérica cuyo peso ronda entre los 34 y 45 kDa dependiendo de su estado de glicosilación; el monómero por su parte pesa alrededor de 16 kDa (no glicosilado). El tamaño de esta proteína 211 aminoácidos en su forma no procesada y una vez madura es de 134 amionacidis [69].

GDNF es el miembro fundacional de una serie de factores que fueron descubiertos posteriormente; Neurturina, Artemina y Persefina. Todos ellos pertenecientes a la familia de ligandos de GDNF [80].

RECEPTORES

Actualmente se conocen 4 receptores para estos ligandos GFR α 1 al 4. Uniéndose a GDNF, Neurturina, Artemina y Persefina respectivamente aunque puede haber cierta interacción entre diversos ligandos-receptores.

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de TGF β pese a la poca identidad entre ellos. Debido a que los GFR α no son capaces de transducir señales al interior de la célula deben hacerlo mediante un correceptor; la unión del ligando permite a los GFR α acoplarse al receptor RET, es este último el que permite la transducción de la señal al interior de la célula mediante su actividad de tirosina cinasa. Lo anterior activa vías como Ras, MAPK y PI3K/Akt. Existen células que son responsivas a GDNF y sin embargo no poseen el receptor RET; es la proteína de adhesión celular neural (N-CAM) que puede sustituir a RET y activar la vía Fak/Fyn, Ras y MAPK [81] (Fig. 13).

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Aunque inicialmente fue descrito que GDNF poseía actividad biológica sobre las NDA sin afectar otras células; estudios posteriores demostraron que GDNF actúa sobre neuronas hipocampales, de la corriente rostral migratoria, cerebelares, corticales, sensoriales y motoneuronas.

EFFECTOS SOBRE LAS NDA

En cultivos de NDA derivadas de mesencéfalo ventral adulto, GDNF favorece la maduración sináptica al permitir la aparición de nuevas terminales sobre las células blanco, también se observa una mayor expresión de proteínas sinápticas como sinapsina [82]. Lin y colegas también mostraron que estos efectos pueden encontrarse en cultivos derivados de mesencéfalos embrionarios. Al cultivar los precursores en presencia de IL-1 o LIF, estas células se vuelven inmunorreactivas

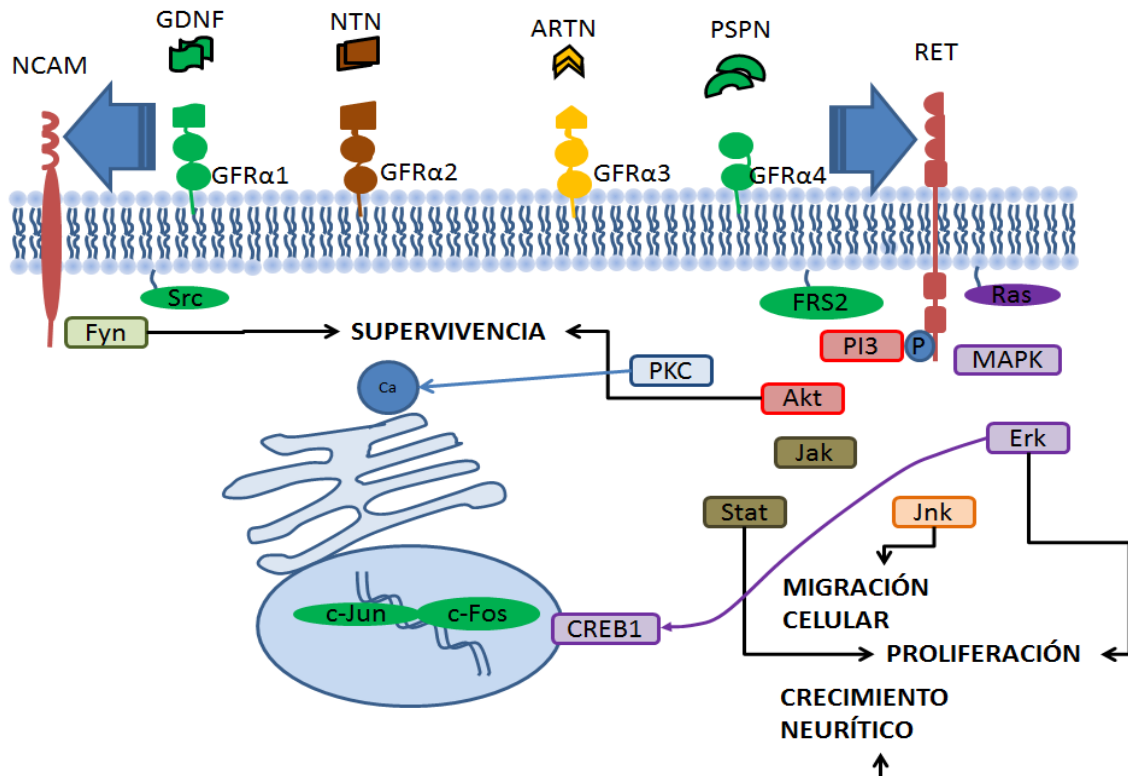


Fig. 13 Familia de ligandos de GDNF y sus receptores; algunos de sus efectores y acciones conocidas.

para TH; sin embargo, no adquieren morfología neuronal pues son células en su mayoría redondeadas, sin extensiones neuríticas. Al agregar a sus cultivos un tercer factor, GDNF; estas células adquieren un fenotipo neuronal [83]. De igual manera, otros autores han demostrado los efectos sobre el tamaño celular, la expresión de marcadores como TH y Calbindina; sin embargo, una mayor expresión de estos se observa con la adición de Neurotrofina 4/5 potenciando el efecto de uno sobre el otro [84]. Otras mezclas incluyen el uso de forskolina con dopamina para incrementar el fenotipo dopaminérgico en presencia de GDNF o BDNF [85]. En este sentido, los efectos de GDNF son específicos pues otros precursores ya especificados (E15) no responden al tratamiento con TGFβ, dAMPc y GDNF; sin embargo, los precursores neurales de mesencéfalo responden aumentando el número de células MAP+. Sun y colaboradores también han usado TGFβ y dAMPc en presencia de GDNF para incrementar el número de NDA [86].

El ratón KO para GDNF muere poco después de nacer debido a agenesia renal; el sistema nervioso entérico también está ausente. Efectos similares se ha observado al generar ratones mutantes para $GFR\alpha 1$ o para RET lo cual confirma el involucramiento de GDNF y su vía de señalización en la génesis de estos órganos. Aunque en estos animales transgénicos el SNC no posee alteraciones macroscópicas evidentes, algunos núcleos motores como son el trigeminal y columnas motoras lumbares, neuronas sensoriales y simpáticas poseen menor número de neuronas. Es de notar que el sistema dopaminérgico no se ve afectado. Estudios con mutaciones condicionales ha mostrado que GDNF es necesario para la supervivencia de las NDA en estados postnatales [87]; sin embargo, estudios más recientes no han logrado replicar estos resultados [88]; por lo que, el papel de GDNF en las NDAs no ha sido completamente esclarecido en organismos completos. Modular o estudiar las funciones de GDNF en preparaciones derivadas de ESC es una valiosa herramienta para incrementar la probabilidad de restaurar la ausencia de estas neuronas y finalmente entender los efectos de GDNF en estas neuronas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inducción neural de las ESC de ratón ha sido usada como modelo celular para entender mecanismos básicos de diferenciación así como para ensayos de neurotoxicidad en NDAs [65] y MNs [70]. Además, estos derivados neurales han sido usados para estudiar la sobrevivencia asociada a la estimulación de receptores específicos para factores neurotróficos como son el GDNF [79, 89, 90].

Los cambios electrofisiológicos que suceden durante el desarrollo de las MNs han sido estudiados. Las propiedades de GDNF en la diferenciación final y más específicamente en la actividad eléctrica y transmisión sináptica han sido estudiadas en *Xenopus laevis* donde GDNF promueve la transmisión sináptica espontánea [91, 92]; sin embargo en MNs y específicamente derivadas de ESC no ha sido estudiado

Otro aspecto importante del estudio de GDNF *in vitro* en la maduración y la sobrevivencia han sido realizado agregando GDNF al medio [84], cultivando las neuronas con medios condicionados con GDNF [93], o cocultivando con astrocitos [44, 94, 95]. En el caso de los experimentos *in vivo*; bombas o células no neuronales que liberan GDNF han sido implantadas o co-trasplantadas con neuronas en protocolos de lesión de médula espinal o de cerebro medio [96-100]. De hecho, cuando las NDA o las MN son trasplantadas por sí mismas, la proporción de supervivencia es baja rondando alrededor del 5 al 10% pero la adición de factores neurotróficos ha demostrado aumentar estos porcentajes [101]; por lo que, neuronas que auto-secreten factores neurotróficos de manera sostenible es una opción factible para facilitar el proceso de supervivencia durante los implantes de neuronas.

Una gran cantidad de conocimiento se ha acumulado respecto a los efectos de GDNF en la supervivencia neuronal; sin embargo, poco se sabe sobre su papel en etapas más tempranas del desarrollo, cuando los precursores neurales aún se encuentran proliferando. Por ejemplo trabajos enfocados en estudiar la localización y expresión temporal de GDNF y sus receptores durante el desarrollo de la medula espinal han demostrado su expresión temprana, cuando el tubo neural recién se ha formado y las células presentes están apenas especificándose y las neuronas postmitóticas son prácticamente nulas; por tanto, GDNF podría estar afectando la especificación, proliferación y/o migración de los precursores neurales, especialmente de las motoneuronas [102-105].

HIPÓTESIS

La sobreexpresión y liberación estable de GDNF en las ESC a lo largo del proceso de diferenciación a NDAs y MNs, aumentará la generación terminal de estos dos linajes neuronales y favorecerá la proliferación de precursores neuronales así como la maduración y supervivencia de las MNs.

OBJETIVO

Estudiar el efecto del GDNF en la diferenciación y supervivencia de las MNs y NDa desde etapas tempranas del desarrollo neural.

OBJETIVOS PARTICULARES

Ensayar el papel de GDNF sobre las ESC para

- Determinar si el GDNF promueve a diferenciación de las ESC hacia los fenotipos dopaminérgicos y de motoneuronas.
- Determinar si el GDNF regula la maduración terminal de las neuronas diferenciadas a partir de ESC

MATERIAL Y MÉTODOS

CONSTRUCCIÓN LENTIVIRAL: Todos los experimentos de DNA recombinante se hicieron de acuerdo a las guías internacionales de investigación relacionadas a moléculas de DNA recombinante. El DNA complementario (DNAc) del gen humano de GDNF (*hGDNF*) se obtuvo mediante un obsequio de la dra. Martha C. Bohn (Chicago. IL) . El plásmido que contiene el *hGDNF* (pAAV-MCS-hGDNF) fue digerido inicialmente con HindIII (5') y SmaI (3') para posteriormente ser separado mediante electroforesis en gel de agarosa y purificado por columna (Qiagen 28704). El fragmento de 639 pb fue ligado en el vector pTRE-tight-BI-AcGFP1 (Clontech 631066) para posteriormente ser extraído con XbaI y HindIII e insertado en el plásmido pTRE2 (Clontech 631008). Finalmente el DNAc fue extraído con XbaI y BamHI en el vector lentiviral pLVX-EF1 α -IRES-Puro (Clontech 631988) para producir el vector lentiviral pLVX-EF1 α -hGDNF-IRES-Puro. Todas las enzimas de restricción fueron adquiridas de New England Biolabs.

PRODUCCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CONTROL (CTRL-ESC) Y QUE SOBREEXPRESAN GDNF (GDNF-ESC): Las partículas lentivirales se produjeron de acuerdo a las instrucciones del productor (Protocolo de Clontech PT5135-1). Plásmidos sin GDNF o vacío (control, CTRL) o que contienen hGDNF más los plásmidos empaquetadores lenti-X HTC y el búfer de reacción se mezclaron con el polímero Xfect para ser vertidos en cajas de cultivo de 10 cm con 5E6 células HEK293FT sembradas un día previo en medio completo KODMEM. 48 horas después de la transfección, los sobrenadantes fueron colectados, centrifugados a 4000 rpm (3200 rcf) por 5 min (ThermoForma 1L GP centrifuge) y filtrados en membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 45 μ m para posteriormetne agregarlos en cultivos de ESC de la línea celular de ratón R1. 24 horas más tarde se inició el tratamiento con puromicina (Sigma P8833) (2 μ g/ml) por 4 días; al término de la selección varias colonias resistentes emergieron. Estas se levantaron y se expandieron de manera clonal para realizar los subsecuentes estudios en varias de las clonas estables.

GENOTIPIFICACION: Después de la selección clonal con puromicina de las ESC, las células fueron lisadas y el DNA genómico fue extraído. Con las muestras obtenidas se realizó PCR punto final por 30 ciclos a 59°C para la temperatura de alineamiento con los oligonucleótidos (todos en 5'->3') para GAPDH: sentido, ATCACCATCTTCCAGGAGCG y antisentido CCTGCTTCACCACCTTCTTG y para el transgen de hGDNF, sentido AACAAATGGCAGTGCTTCCT; antisentido AGCCGCTGCAGTACCTAAAA. El mismo protocolo y oligonucleótidos fueron usados para la retrotranscripción de RNAm [106, 107].

WESTERN BLOT: Brevemente, las células fueron homogenizadas en un buffer de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7, 1% IGEPAL ©, 100 mM NaCl) suplementado con un inhibidor de proteasa (Roche). Las proteínas fueron obtenidas por centrifugación a 13800 g a 4°C por 15 min y finalmente cuantificadas por el método de Bradford.

(BioRad). 30 µg de proteína se resolvieron en un gel de poliacrilamida – duodecil sulfato de sodio y transferido a membranas de nitrocelulosa (Amersham Bioscience). Las membranas fueron bloqueadas con leche baja en grasa al 5% e incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios. Se usaron los anticuerpos conejo anti-GDNF H-134 (sc-9010 Santa Cruz) y anti-GAPDH (MAB374 Millipore). Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa HRP cabra anti-conejo (sc-2030, 1:10000, Santa Cruz Biotechnology) por dos horas. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas usando el método de quimioluminiscencia (Amersham Bioscience) y revelado en placas fotográficas (Kodak).

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN ACOPLADO A ENZIMA PARA LA DETECCIÓN DE GDNF: Para cuantificar el GDNF secretado, se utilizó el medio condicionado por 24 horas de células CTRL-ESC y GDNF-ESC. El medio fue recolectado desde un estado pluripotencial indiferenciado de las ESC, durante los 3 pasos intermedios de diferenciación dopaminérgica y en el estado neuronal diferenciado final (ver siguiente sección). De igual manera, detecciones al final de la diferenciación hacia motoneuronas fueron realizadas (día 6 de diferenciación). El kit de inmunoensayo de GDNF Emax se obtuvo de Promega y se usó de acuerdo al fabricante.

DIFERENCIACIÓN DE ESC A NDAs: para la diferenciación de este fenotipo neuronal, se siguieron protocolos publicados [65, 66]. Las ESC se mantuvieron en estado indiferenciado en medio KO DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamax, 55 µM de 2-mercaptoetanol, 50 UI/ml de penicilina-estreptomina (todos de Invitrogen) y 1000 UI de factor inhibidor de la leucemia (ESGRO, Millipore). Las células se disociaron para formar cuerpos embrioides (EBs) en placas no adherentes durante 4 días. Posteriormente, EBs se vuelven a crecer en cultivos adherentes por 6 días más en medio ITSFn (medio DMEM:F12 con insulina 50 mg/ml, transferrina 25 mg/L, selenito 0.5 mM, y fibronectina 5µM) (Invitrogen). Al finalizar, las células se disociaron y se sembraron en cajas recubiertas de poli-L-ornitina y fibronectina en medio N2 (DMEM:F12, suplemento N2, 0.5 mM glutamax) por 6 días en presencia de FGF2 (20 ng/ml, Peprotech), FGF8 (100 ng/ml, Peprotech), SHH (500 ng/ml, R&D systems) y ácido ascórbico (200 µM, Sigma-Aldrich). Finalmente, se retiran los factores de crecimiento para permitir que los precursores neurales diferencien a NDAs postmitóticas.

PRODUCCIÓN DE LAS LÍNEAS REPORTERAS PARA MONITOREAR LA DIFERENCIACIÓN A MNs: Las líneas CTRL-ESC o GDNF-ESC fueron electroporadas con el plásmido HB9:GFP (una donación del Dr. Hynek Wichterle NY, USA) y seleccionadas con neomicina (500 µg/ml) o higromicina B (150 µg/ml) respectivamente para crear las líneas CTRL-ESC/HB9::GFP y GDNF-ESC/HB9::GFP.

DIFERENCIACIÓN DE MOTONEURONAS A PARTIR DE ESC: Las motoneuronas se diferenciaron de acuerdo a lo reportado en protocolos previos [70] con algunas modificaciones menores. Brevemente, cultivos de ESC fueron disociados y cultivados en suspensión para crear EB en medio DFNK (DMEM:F12, Neurobasal, 10% remplazo de suero, 0.5 mM glutamax, 35 μ M 2-mercaptoetanol and 50 UI/ml penicilina-estreptomocina) (Invitrogen) a los cuales se les cambió el medio cada 48 horas. Del día 2 al día 6 los EBs se crecieron en presencia de 2 μ M de ácido retinoico purmorfamina (Millipore) 10 μ M. Al día 6 de diferenciación, los EBs se disocian con tryple express (Invitrogen), y se siembran en cubreobjetos recubiertos con poli-Lornitina y fibronectina en medio N2B27 (DMEM:F12, Neurobasal, suplemento N2, suplemento B-27, y penicilina-estreptomocina) (Invitrogen) por 3 días más

ENSAYOS DE TOXICIDAD: NDAs terminalmente diferenciadas se incubaron con la neurotoxina 6-OHDA, 200 μ M (Sigma H4381) por una hora y se evaluaron 24 horas después por inmunofluorescencia [93]. MNs terminalmente diferenciadas fueron expuestas a 300 μ M de kainato (Sigma K2389) por 20 minutos y evaluadas a las 24 horas por inmunofluorescencia [108].

INMUNOFLUORESCENCIA: Cultivos celulares se fijaron en 4% de paraformaldehído por 20 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con 0.3% de Triton X-100 (Sigma). Anticuerpos primarios se incubaron por toda la noche a 4°C en un buffer de solución salina de fosfatos (PBS) más 10% de suero normal de cabra. Las células se lavaron 3 veces y se incubaron por dos horas con anticuerpos secundarios. Los anticuerpos primarios se usaron en la siguiente dilución: Oct 3/4, 1:200 (B&D 611202); Sox2, 1:1000 (Millipore AB5603); GFP, 1:1000 (Invitrogen A11122); Olig2, 1:1000 (Millipore MANB50); Islet1, 1:10 (developmental studies and hybridoma bank 40.3A4-5 and 40.2D6); Tirosina hidroxilasa, 1:1000 (Pel-freez P40101-150) y Tirosina hidroxilasa 1:400 (Pel-freez P60101-150); TUJ1, 1:1000 (Covance MRB-435P); MAP2, 1:1000 (Chemicon MAB378); Lmx1b, 1:200 (Abcam ab66991); FoxA2, 1:500 (Millipore 07-633); Girk2, 1:200 (Alomone APC-006); Phospho Histone, H3, 1:100 (Cell Signaling 9701S) Calbindina, 1:200 (Sigma 9848); Serotonina, 1:500 Sigma S5545), GAD 1:200 65/67, ChemiconAB1511). Anticuerpos secundarios acoplados a Alexa fluor se usaron a una dilución 1:1000 (Life Technologies). EBs cultivados por 5 días se recuperaron por gravedad, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído y se criopreservaron en sacarosa y se embebieron en tissue-tek (Sakura 4583) para ser cortados en rebanadas de 20 μ m y montarse en portaobjetos para someterlos a la técnica de inmunofluorescencia.

ELECTROFISIOLOGÍA: La expresión de la GFP bajo el elemento regulatorio del promotor HB9 nos permite la identificación de las MNs diferenciadas. Debido a que el principal interés de varios estudios previos es la expresión del fenotipo MN, estas neuronas se co-cultivaban con células musculares y permiten la creación de sinapsis entre MNs derivadas de ESC y células musculares [44, 109], Sin embargo, para probar las acciones aisladas de un solo factor neurotrófico como

puede ser GDNF en la diferenciación de ESC a motoneuronas, se prefirió usar medios definidos y no usar co-cultivos que puedan liberar factores adicionales desconocidos. Para esto se realizaron registros electrofisiológicos de célula completa en células GFP positivas fijadas en cubreobjetos e identificadas bajo el microscopio de fluorescencia. Muestras control y que sobreexpresan GDNF se registraron después de 9 días *in vitro* para obtener diferentes signos de maduración eléctrica y excitabilidad.

Junto con los signos de excitabilidad, se midieron propiedades de membrana como potencial de membrana en reposo (RMP) y resistencia de entrada en célula completa (R_N). Después de ser identificadas, las neuronas se visualizan usando el microscopio infrarrojo de interferencia diferencial (DIC, Nikon Instruments Inc., Melville, N.Y. U.S.A). Micropipetas para los registros de célula completa se produjeron (Sutter Instrument, Novato, CA) de tubos de borosilicato (1.5 mm OD, WPI, Sarasota, FL) para una resistencia final de DC de 4-6 M Ω cuando son llenadas con una solución interna con la siguiente composición en mM: 120 KMeSO₃, 10 NaCl, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg²⁺-ATP, 0.4 Na⁺-GTP y 1% biocitina (pH=7.2, 282 mOsM/L) para pCa²⁺ alrededor de 6.5 [110]. La solución extracelular en mM: 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄ and 15 glucosa (pH=7.4, 300 mOsm/l, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂). Los registros se hicieron a temperatura ambiente (~25°C) y se obtuvieron con un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) mientras se monitoreaban con un osciloscopio (Tektronix Inc, Beaverton, OR, USA) [111]. Las señales se filtran a 1-3 kHz y se digitalizan a 3-9 kHz con un AT-MIO-16E4 (National Instruments, Austin, TX).en una PC. Para a adquisición de datos se utilizó un programa diseñado en LabVIEW environment (National Instruments).

R_N fue extraída de la pendiente de corriente-voltaje (curvas I-V) a -60 mV. Esta fue obtenida de las lo pasos despolarizantes e hiperpolarizantes rectangulares de voltaje (current-clamp) o comandos de voltaje (voltage-clamp). Potencial de membrana en reposo (RMP) se midió en current-clamp a corriente cero. Los porcentajes de neuronas con diferentes signos de excitabilidad que sugieren diferentes etapas de diferenciación fueron obtenidos en ambas muestras y comparados (ver resultados).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS: todos los experimentos se realizaron por duplicado con una n= 3 ó 4, indicado al pie de la figura en cada experimento. Los resultados se sometieron a ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de Bonferroni; en otros casos a pruebas *t* de student. En el caso de los registro electrofisiológicos Mann-Whitney U fue usado como prueba para comparar muestras no pareadas. Tratamientos múltiples se compararon con ANOVA Kruskal-Wallis y prueba *post-hoc* de Dunn. Potenciales de acción de rebote (RAP), rectificación entrante (sag) y potenciales de Calcio fueron comparados usando la prueba de Chi cuadrada en cuyo caso p<0.05 fue usada como nivel de significancia.

RESULTADOS

GENERACIÓN DE ESC QUE EXPRESAN GDNF

Para producir líneas estables de células troncales embrionarias que secretan GDNF se prepararon vectores lentivirales que confieren resistencia a puromicina (CTRL) o simultáneamente permiten la expresión de hGDNF y la resistencia a puromicina. (Fig. 13 izquierda) Para ello se purificó el DNAc de *hGDNF* y se ligó en el plásmido lentiviral para generar el plásmido pLVX-EF1 α -hGDNF-IRES-Puro. Partículas de este lentivirus fueron cosechadas y agregadas a los cultivos de ESC. 24 horas después, puromicina fue añadida por 4 días para obtener clonas resistentes las cuales se levantaron para ser expandidas individualmente. En todos los experimentos realizados al menos tres líneas celulares fueron analizadas mostrando resultados similares. Se comprobó la integración del transgen mediante genotipificación usando oligonucleótidos específicos para el transgen de *hGDNF*, mismos que son incapaces de detectar la versión endógena de *gdnf*. Al realizar PCR punto final corroboramos la integración del transgen en todas las clonas obtenidas y nombramos a estas GDNF-ESC. Las células transducidas con el vector vacío se les denominó CTRL-ESC (Fig. 15A panel superior). Mediante

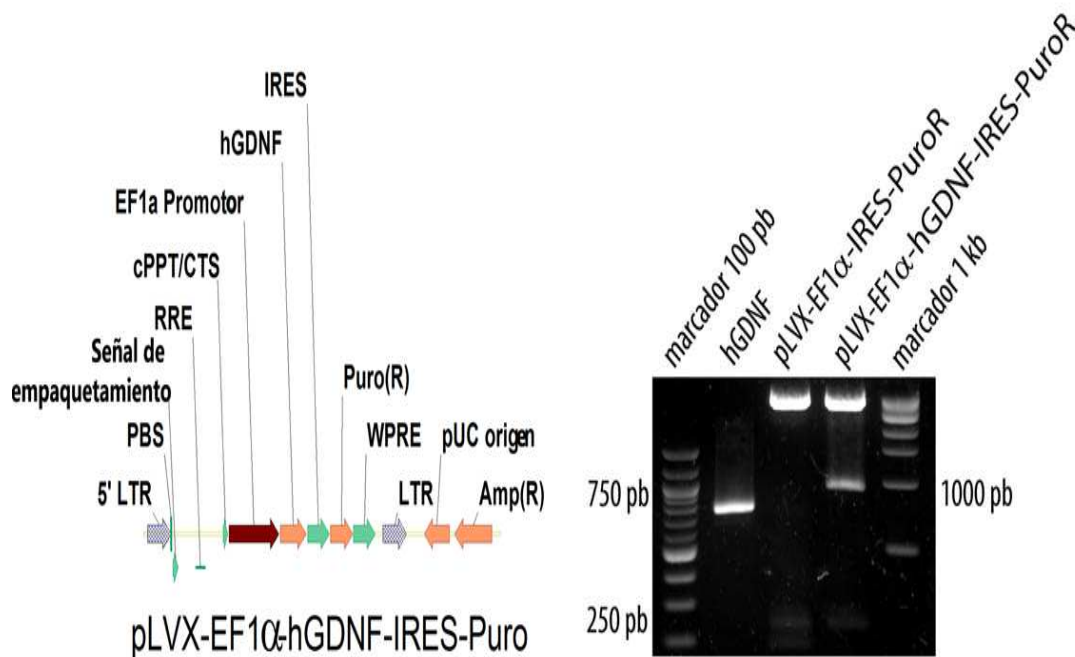


Fig. 14. Izquierda. Esquema de la construcción lentiviral EF1 α ::hGDNF cuyo promotor constitutivo permite la expresión de *hGDNF* y a través de un IRES la expresión del casete de resistencia a Puromicina. Derecha, gel de agarosa donde se muestra en el primer y último carriles marcadores de 100 y 1000 pb respectivamente. En el segundo carril el DNAc de hGDNF, en el tercer carril el vector el vector digerido (obsérvese dos pequeñas bandas en la parte inferior del carril). En el carril 4 la ligación de ambos para generar una banda de 1000 pb que corresponde a *hGDNF*.

RT-PCR se demostró que las clonas GDNF-ESC son capaces de expresar el transgen de hGDNF pero no así en las células CTRL-ESC (Fig. 15A panel medio e inferior).

Buscamos la proteína de GDNF mediante Western blot a partir de lisados de ESC en estado indiferenciado y encontramos que en el caso de las GDNF-ESC la proteína es detectable mientras que en las CTRL-ESC no fue posible encontrarla (Fig. 15B); sin embargo, para que sea funcional, esta proteína se sabe tiene que secretarse por lo que realizamos una prueba de ELISA desde un estado indiferenciado y recolectando medio a través de cada una de las etapas de diferenciación hasta su estado final. Lo que observamos fue una cantidad

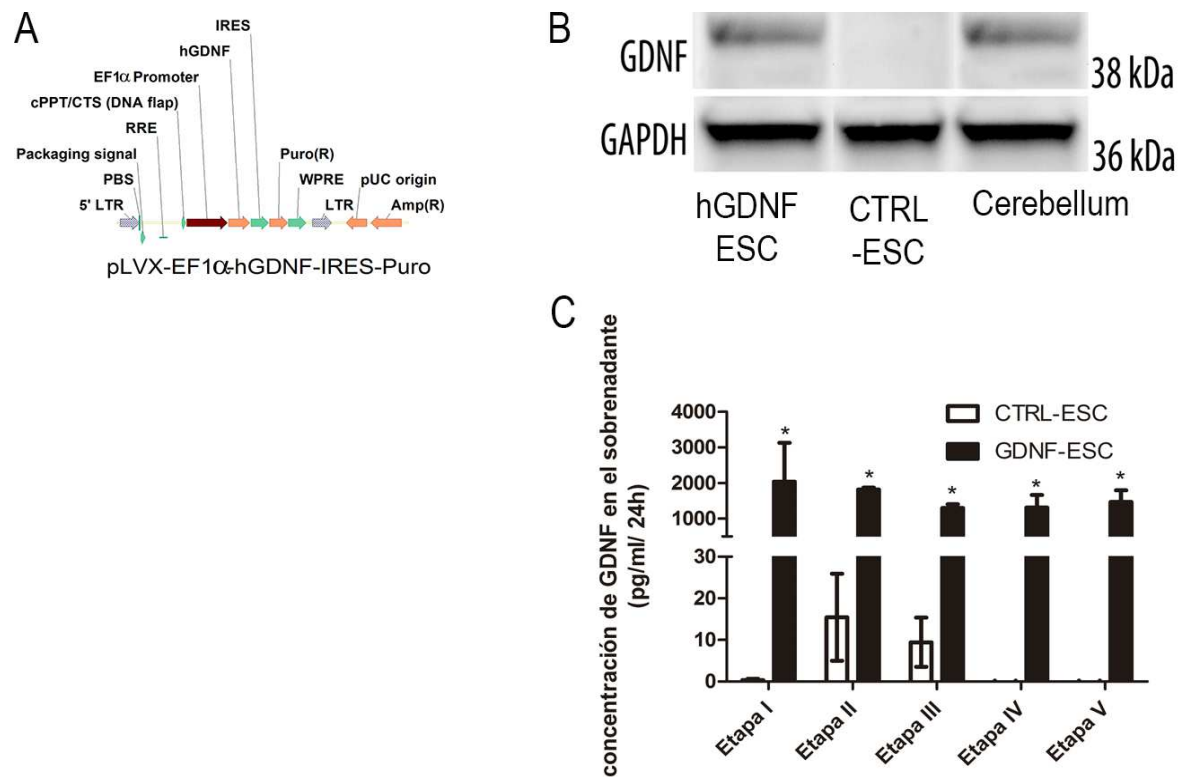


Fig. 15 *hGDNF* se expresa efectivamente en las ESC de ratón y en neuronas diferenciadas. A) en el panel superior se muestra la integración de *hGDNF*. En el panel medio la expresión del RNAm de *hGDNF* únicamente en las *hGDNF*-ESC. Panel inferior RTPCR sin retrotranscriptasa. B) Western blot para detectar GDNF en los lisados celulares. Cerebelo de rata adulta fue usado como control positivo. C) Cuantificación de GDNF en medios condicionados de las 5 etapas de diferenciación de dopamina cuantificadas por ELISA $p < 0.001$ contra CTRL-ESC en la misma etapa. se muestra en el primer y último carriles marcadores de 100 y 1000 pb respectivamente. En el segundo carril el DNAc de *hGDNF*, en el tercer carril el vector el vector digerido (obsérvese dos pequeñas bandas en la parte inferior del carril). En el carril 4 la ligación de ambos para generar una banda de 1000 pb que corresponde a *hGDNF*.

abundante de GDNF en cada uno de los puntos de medición en las GDNF-ESC; por el contrario, las células sin el transgen son incapaces de producir GDNF y aunque en algunas etapas fue detectable, la diferencia entre ambos casos fue de varios órdenes de magnitud (Fig. 15C). Para analizar si la producción transgénica de GDNF modifica la expresión de factores asociados a un estado pluripotencial diferenciado, se buscó mediante inmunofluorescencia los factores transcripcionales Sox2 y Oct4 con niveles similares de expresión tanto en células control como en las que sobreexpresan GDNF (Fig. 16), lo cual sugiere que el estado pluripotencial no se ve alterado.

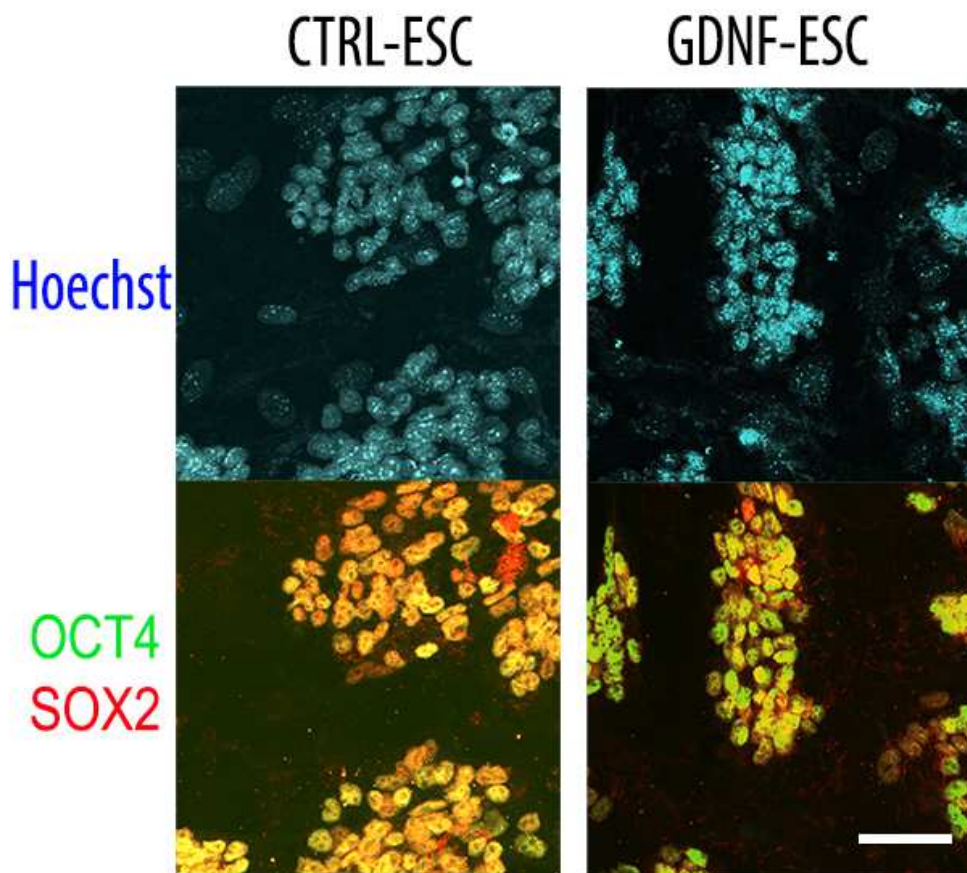


Fig. 16 . Las ESC transgénicas no pierden la expresión de marcadores asociados a la pluripotencia mantenidas en estado indiferenciado. Tinción para Sox2 y Oct4 en las líneas transgénicas de CTRL- y GDNF-ESC. Aumento de las micrografías a 60x

GDNF para realizar sus efectos fisiológicos tiene que unirse al complejo receptor conformado por $\text{GFR}\alpha 1$ y el correceptor RET. Buscamos la expresión de estos por RT-PCR punto final y encontramos que este complejo se encuentra desde un estado indiferenciado pluripotencial (etapa 1) en las ESC y en la etapa final de la diferenciación hacia las NDA (etapa 5) (Fig. 17).

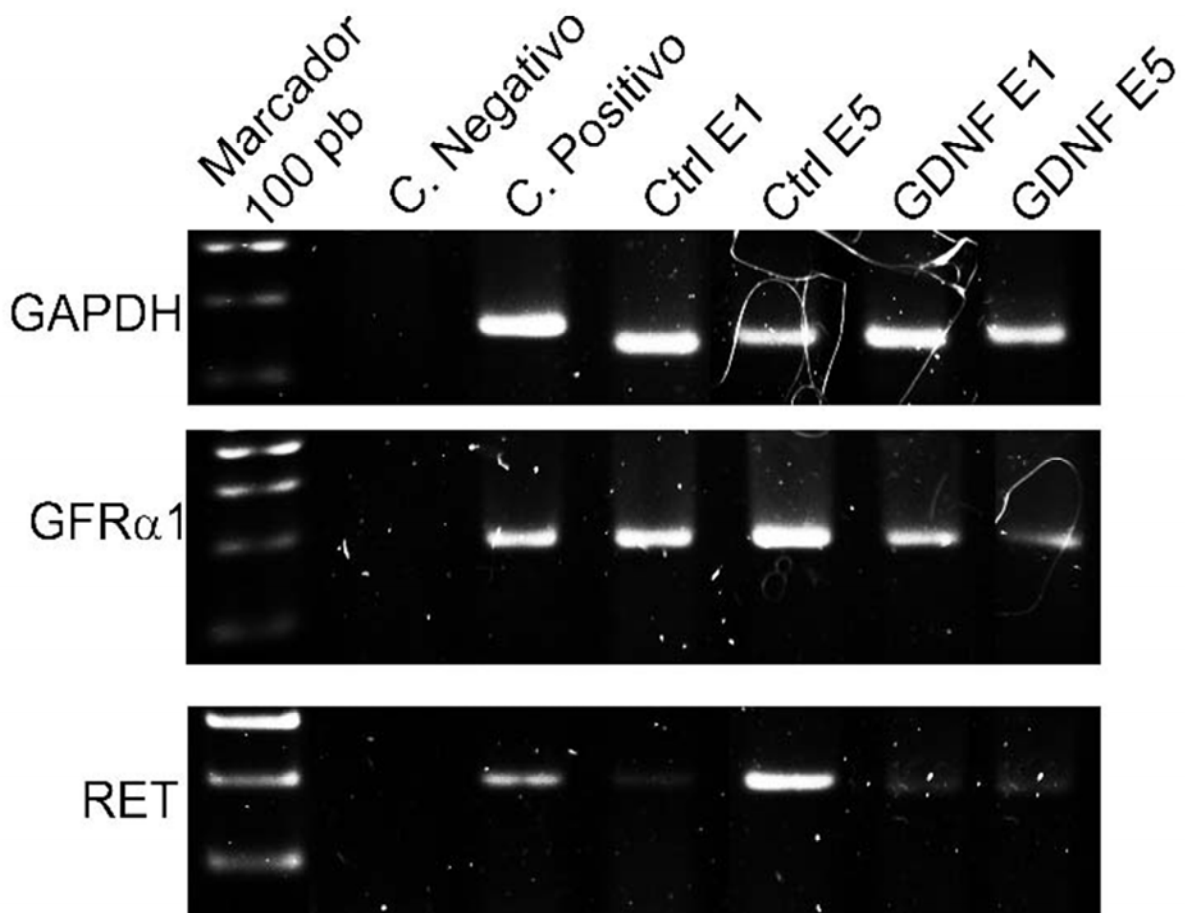


Fig. 17. El complejo receptor para GDNF, $\text{GFR}\alpha 1$ y Ret se expresan tanto en ESC indiferenciadas como en neuronas terminales. Control negativo agua, control positivo, extracto abdominal de embrión de rata de 14 días. Ctrl se refiere a las

GDNF-ESC POSEEN UNA MAYOR DIFERENCIACIÓN HACIA NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE CEREBRO MEDIO.

Una vez que establecimos que el transgen de hGDNF se produce establemente; y que las ESC expresan el complejo receptor para GDNF; CTRL- y GDNF-ESC se diferenciaron a neuronas dopaminérgicas por el protocolo de 5 etapas de diferenciación. Al final del protocolo, se analizó por inmunofluorescencia la

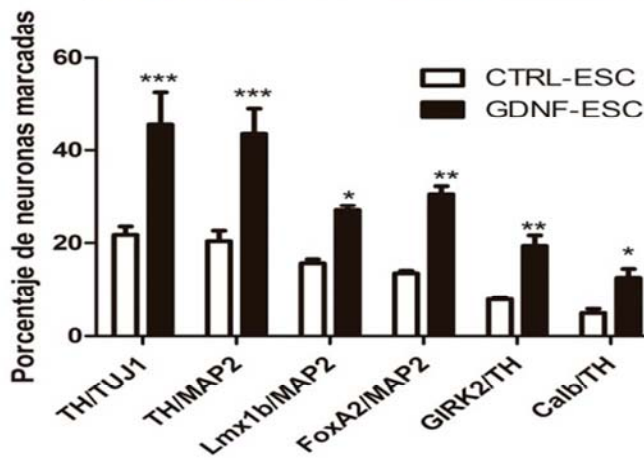
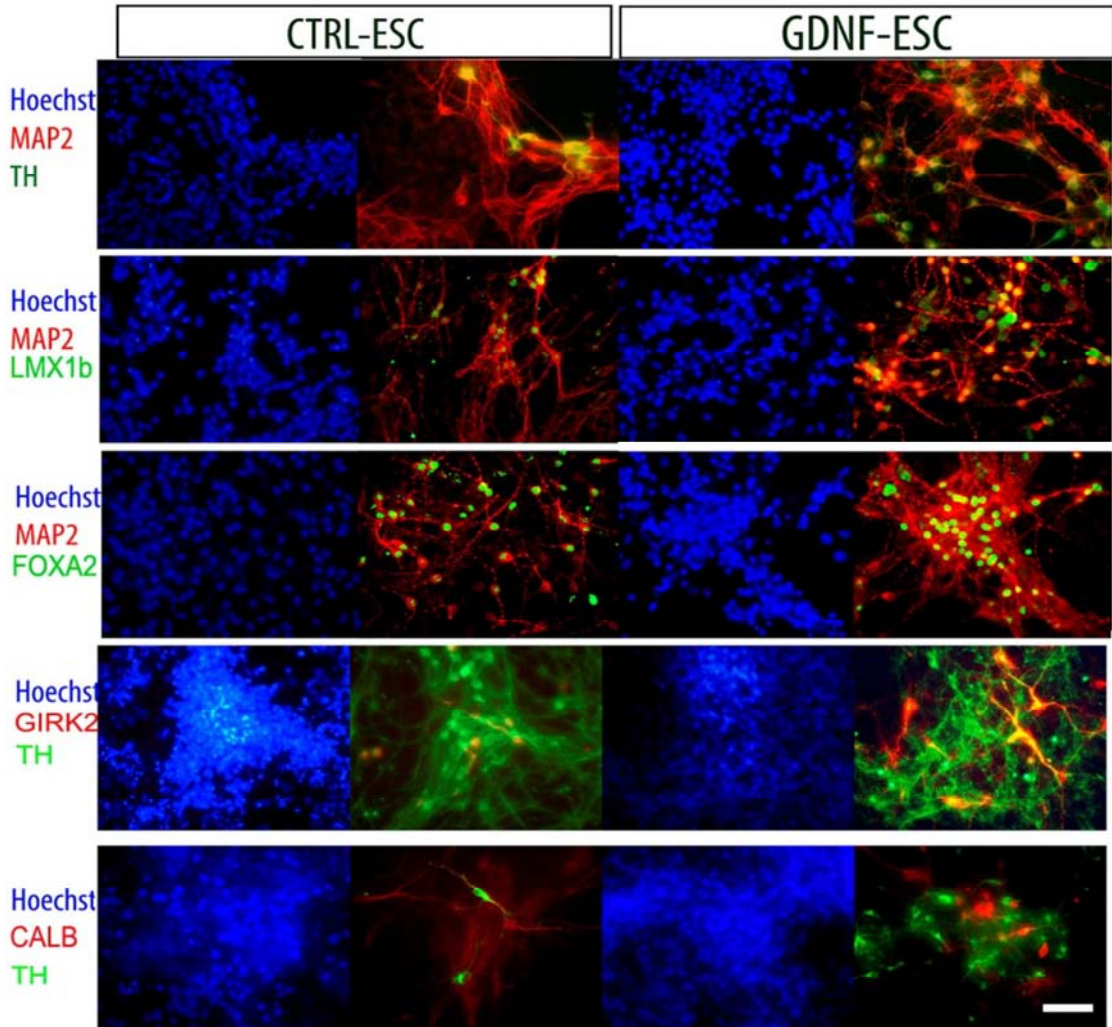


Fig. 18. La sobreexpresión de GDNF incrementa el número de neuronas TH+ con fenotipo de cerebro medio. Inmunotinción para marcadores terminales de diferenciación dopaminérgica de cerebro medio. Cuantificación de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. Aumento 60x. ***p<0.0001, **p<0.001 y *p<0.05

expresión de TH, la enzima limitante en la síntesis de dopamina. Las células que sobreexpresan GDNF diferenciaron a neuronas TH+ en más del doble respecto a las células control (Fig. 18). Este efecto positivo en la expresión de TH fue observado no solo en neuronas jóvenes positivas para β III tubulina (detectado con el anticuerpo TUJ1), sino también en neuronas maduras (MAP2+). Factores transcripcionales que son importantes para la especificación de NDAs mesencefálicas como son Lmx1b y FoxA2 fueron también analizados [112-114]. Observamos que las GDNF-ESC doblaban el número de neuronas que expresan estos marcadores (Fig. 18).

En el cerebro medio existen 2 áreas dopaminérgicas que están íntimamente relacionadas, el área ventral tegmental (VTA) y la SNpc [115]. En la enfermedad de Parkinson, la pérdida masiva de neuronas NDAs ocurre en la SNpc y mínimamente en el VTA [116]; por tanto, incrementar el número de NDA con fenotipo del área de la SNpc sería de gran relevancia. GIRK2 es un canal de potasio rectificador entrante sensible a proteína G enriquecido en la SNpc [117]. El número de neuronas GIRK2+ aumentó significativamente en las células que sobreexpresan GDNF; sin embargo, las neuronas doble positivas para TH y Calbindina también aumentaron (Fig. 18). Debido a que el protocolo de diferenciación no produce únicamente NDAs, analizamos si otro tipo de estirpes dopaminérgicas son modificadas por la sobreexpresión de GDNF. Neuronas serotoninérgicas aparecen en la diferenciación pero no se ven modificadas por el GDNF (Fig. 19). Analizamos también neuronas GABAérgicas cuya expresión en los cultivos fue apenas perceptible en ambas condiciones (datos no mostrados). La aparición de estas neuronas no es sorprendente pues otros autores han reportado ya la generación de estas neuronas por este protocolo [65]; lo importante aquí es que GDNF es selectivo al inducir la diferenciación a un linaje dopaminérgico de cerebro medio.

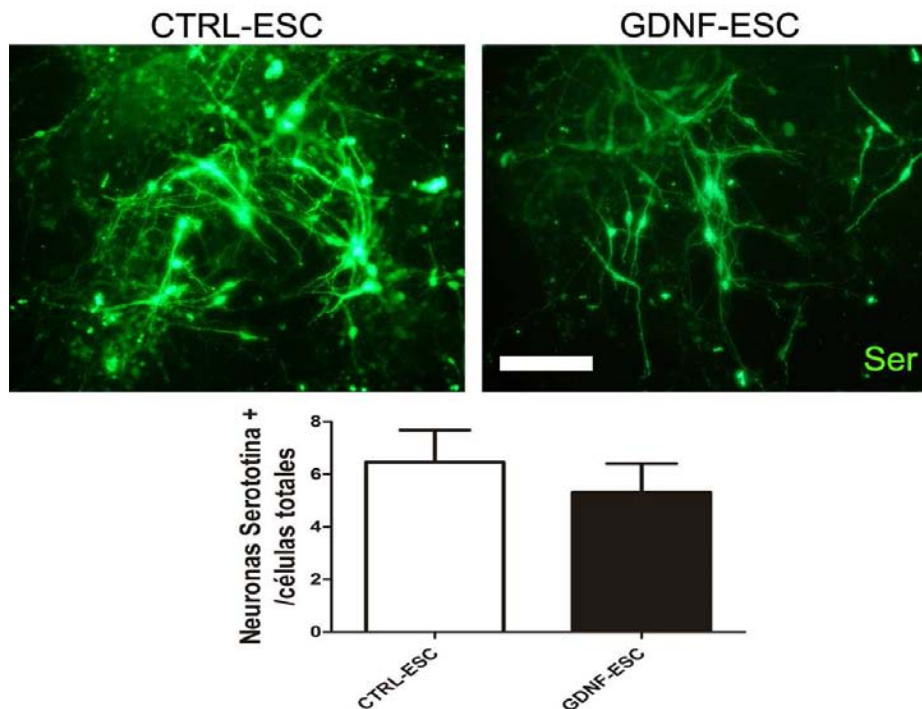


Fig. 19. La expresión transgénica de GDNF no modifica el número de neuronas serotoninérgicas durante el proceso de diferenciación a NDA a partir de ESC de ratón. Cuantificación de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. células control en etapa 1 (E1) y en etapa 5 (E5) de diferenciación dopaminérgica. Los carriles GDNF refiere a las clonas que sobreexpresan GDNF.

LA SOBREENPRESIÓN DE GDNF HACE RESISTENTES A LAS NDA ANTE LA TOXINA 6-OHDA *IN VITRO*.

Las NDAs suelen ser afectadas selectivamente por la neurotoxina 6-OHDA el cual induce disfunción mitocondrial y estrés oxidativo [118]. Se ha realizado una gran variedad de experimentos que demuestran que la adición de GDNF al medio de NDAs disminuye la muerte neuronal ocasionada por 6-OHDA [119]. En el presente trabajo diferenciamos las ESC a NDAs y las retamos a 6-OHDA 200 μ M. Cuando las NDAs derivadas de las CTRL-ESC se contaron 24 horas después, hubo una disminución significativa de células TH+ (74.3 - 83.9%) y aunque en las NDAs diferenciadas a partir de las GDNF-ESC también hubo muerte, esta fue significativamente menor (43.8 - 49.9). Por tanto, las GDNF-ESC que se diferenciaron a NDAs poseen 2.5 veces mayor resistencia a la toxicidad de 6-OHDA (Fig. 20).

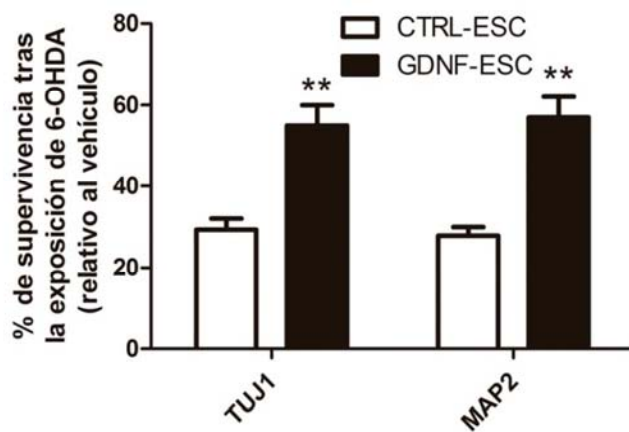
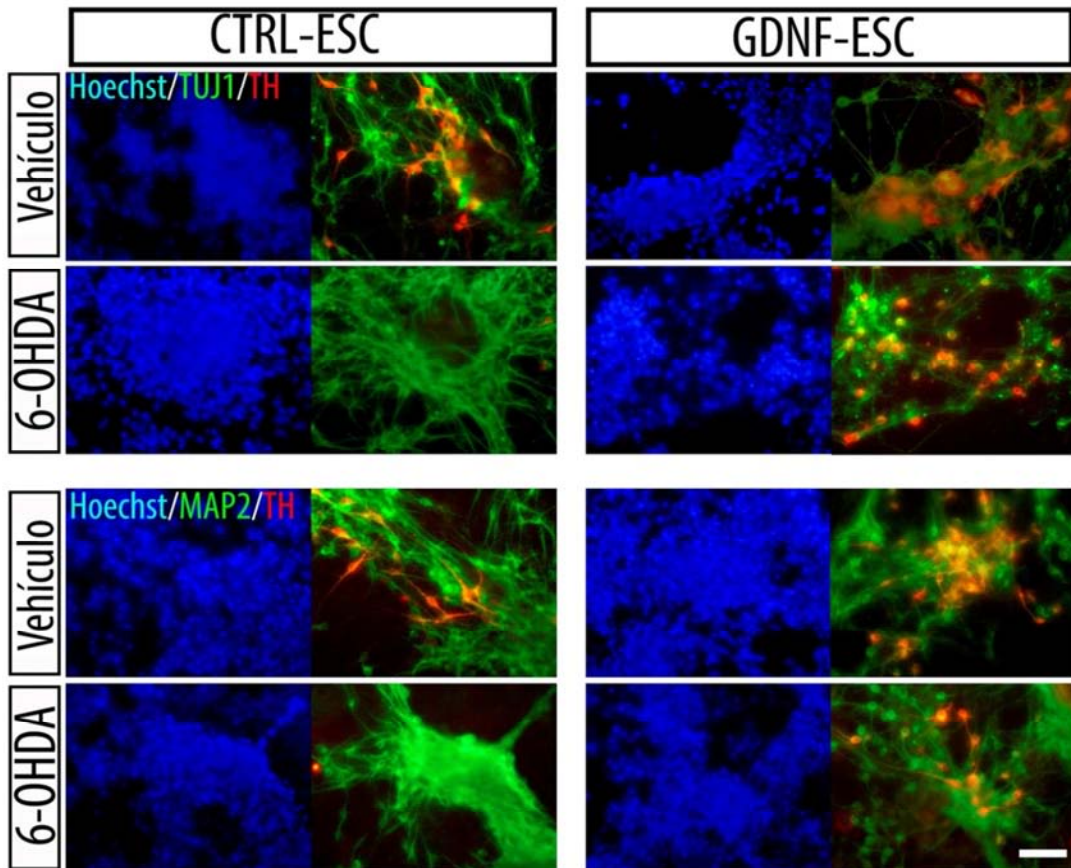


Fig. 20. La sobreexpresión de GDNF previene la muerte de las neuronas TH+ causada por 6-OHDA. Microfotografías de ESC diferenciadas a NDA inmaduras (panel superior) y maduras (panel inferior) tratadas ya sea con 6-OHDA o vehículo. La cuantificación fue obtenida de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Aumento 60x. * $p < 0.05$ versus CTRL-ESC; # $p < 0.05$ versus GDNF-ESC. % $p < 0.05$ versus GDNF-ESC.

LAS CÉLULAS GDNF-ESC PRODUCEN MÁS PRECURSORES DE MNs Y UN MAYOR NÚMERO DE MNs POSTMITÓTICAS.

GDNF es conocido por tener otros blancos celulares dentro de las cuales están incluidas las MNs. Decidimos estudiar la diferenciación de MNs mediante el uso de una construcción reportera la cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP) dirigida por el promotor HB9 el cual solo activa la expresión de la GFP en MN postmitóticas. El plásmido HB9:GFP fue co-transfectado con casetes de resistencia a neomicina o higromicina B en células CTRL- o GDNF-ESC respectivamente y seleccionadas con el antibiótico apropiado para generar las líneas CTRL-ESC/HB9::GFP o GDNF-ESC/HB9::GFP (Fig. 21A y 21B).

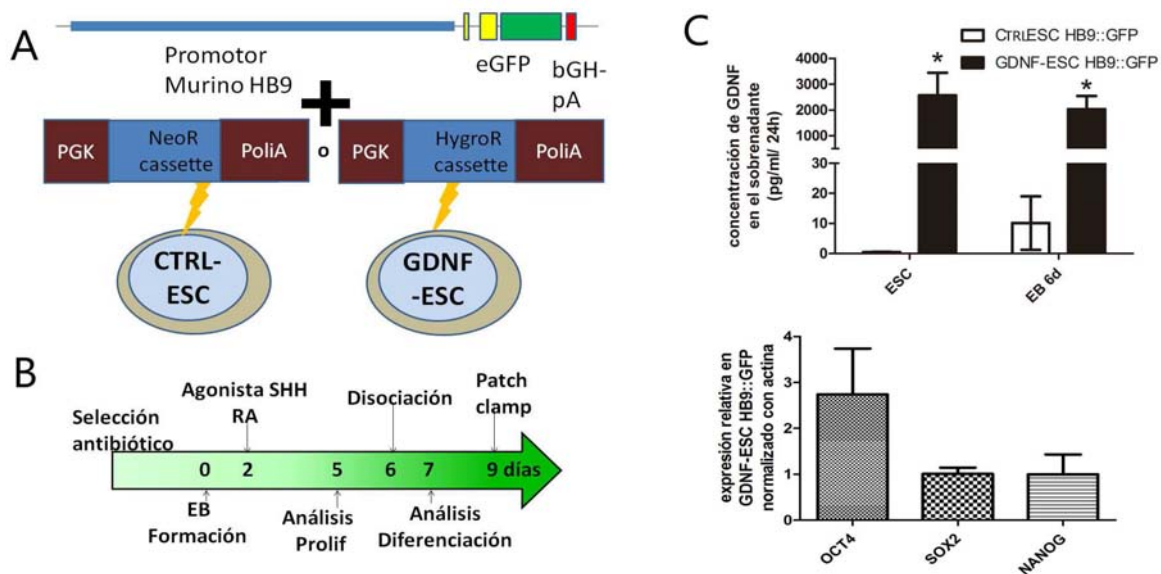


Fig. 21. Generación de dobles transgénicos GDNF y HB9::GFP. A) Vector HB9::GFP que permite la expresión de la GFP bajo el promotor específico de motoneuronas espinales HB9 que fue co-electroporado con casetes de resistencia de neomicina o higromicina B en células control y GDNF respectivamente. B) La flecha verde inferior indica el proceso de diferenciación de MN y los puntos de evaluación durante la obtención de MN. C) Cuantificación de GDNF en el medio después de 24 horas de incubación en ESC indiferenciadas y después de 6 días de diferenciación hacia MNs. * $p < 0.001$ respecto al control. $n = 3$ con experimentos por duplicado.

Determinamos la liberación de GDNF por ELISA en estado indiferenciado y observamos de manera similar a lo encontrado en la diferenciación dopaminérgica que el proceso de diferenciación a MNs no altera la expresión de GDNF y está permanece constante (Fig. 21C). A su vez, la expresión de los transgenes en las GDNF-ESC/HB9::GFP comparado contra células control no modifica el estado pluripotencial, esto medido por PCR cuantitativo de genes asociados a pluripotencia como son *Oct*, *Sox2* y *Nanog* aunque *Oct4* se incrementa casi 3 veces en las células GDNF-ESC/HB9::GFP este cambio no es estadísticamente significativo (Fig. 21D). Para estudiar los efectos de GDNF en la diferenciación a MNs varias clonas fueron seleccionadas y genotipificadas para determinar la

integración del plásmido (datos no mostrados). Los experimentos se realizaron en 6 clonas para validar la reproducibilidad de los datos (3 para CTRL-ESC/HB9::GFP y 3 para GDNF-ESC/HB9::GFP) obteniendo datos similares para cada grupo de clonas. Durante la formación de los cuerpos embrioides (EBs) notamos que los EBs de las líneas GDNF-ESC/HB9::GFP eran de mayor tamaño que los controles; incluso antes que se pudiera detectar alguna marca para GFP lo cual nos indicaba que GDNF podría tener efectos previos a la aparición de las MNs; probablemente, en la tasa de proliferación. Olig2 es un factor transcripcional que regula la replicación de precursores que posteriormente se convertirán primero, en MNs y después, en oligodendrocitos [120]. Al día 5 del proceso de

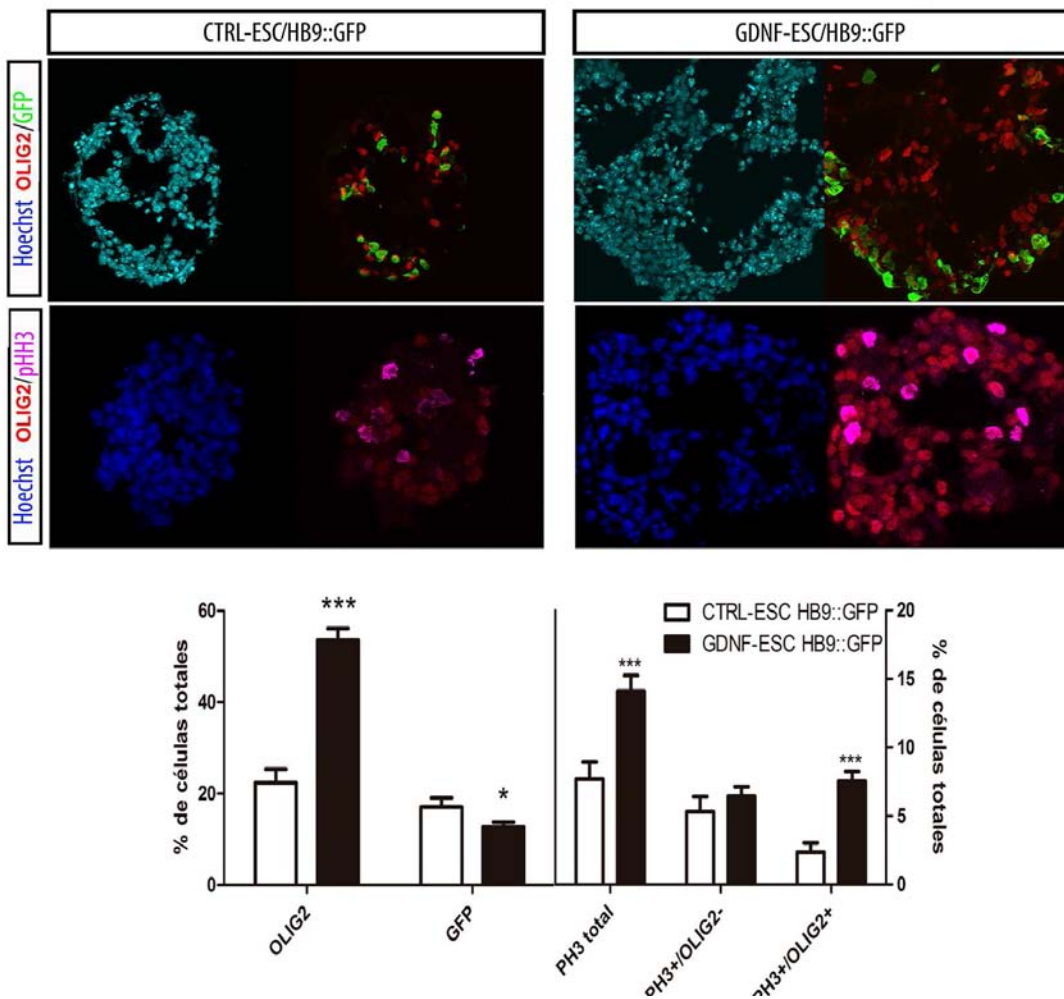


Fig. 22. La sobreexpresión de GDNF favorece la proliferación de los pMN. Panel superior, micrografías representativas del día 5 de diferenciación de EBs teñidos para precursores de motoneuronas (Olig2+) y MNs GFP+. Panel inferior, EBs fueron marcados con los anticuerpos contra Olig2 y fosfo-histona H3 (pHH3), una marca de proliferación que se encuentra aumentada en las GDNF-ESC/HB9::GFP. La gráfica muestra la cuantificación de los experimentos mostrados en ambos paneles. Resultados de 4 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$. Aumento 60x panel superior, 63x panel inferior

diferenciación, los EBs se fijaron, cortaron y se realizaron inmunofluorescencias para Olig2 y GFP (Fig. 22 panel superior). Los EBS derivados de las células GDNF-ESC/HB9::GFP presentaban significativamente, un mayor número de células positivas a Olig2 comparadas con las CTRL-ESC/HB9:GFP. De forma paralela y contraria, en los EBs que sobreexpresaban GDNF se observó una disminución discreta pero significativa de neuronas jóvenes positivas a GFP en comparación con los EBs control (Fig. 22). Después, nos preguntamos si la expansión de células Olig2 era causada por un aumento en la tasa de proliferación de estas células. La fosforilación de la Serina 10 de la Histona H3 (pHH3) se sabe está asociada a la actividad mitótica [121]. En cultivos de GDNF-ESC/HB9::GFP observamos un incremento en los números de células pHH3 positivas (Fig. 22 panel inferior). También observamos un doble marcaje para Olig2 y pHH3 el cual se incrementó significativamente en presencia de GDNF; en cambio, la proliferación de otras células diferentes a los precursores de MNs no se vio afectada. Por tanto, los efectos proliferativos de GDNF parecen estar dirigidos

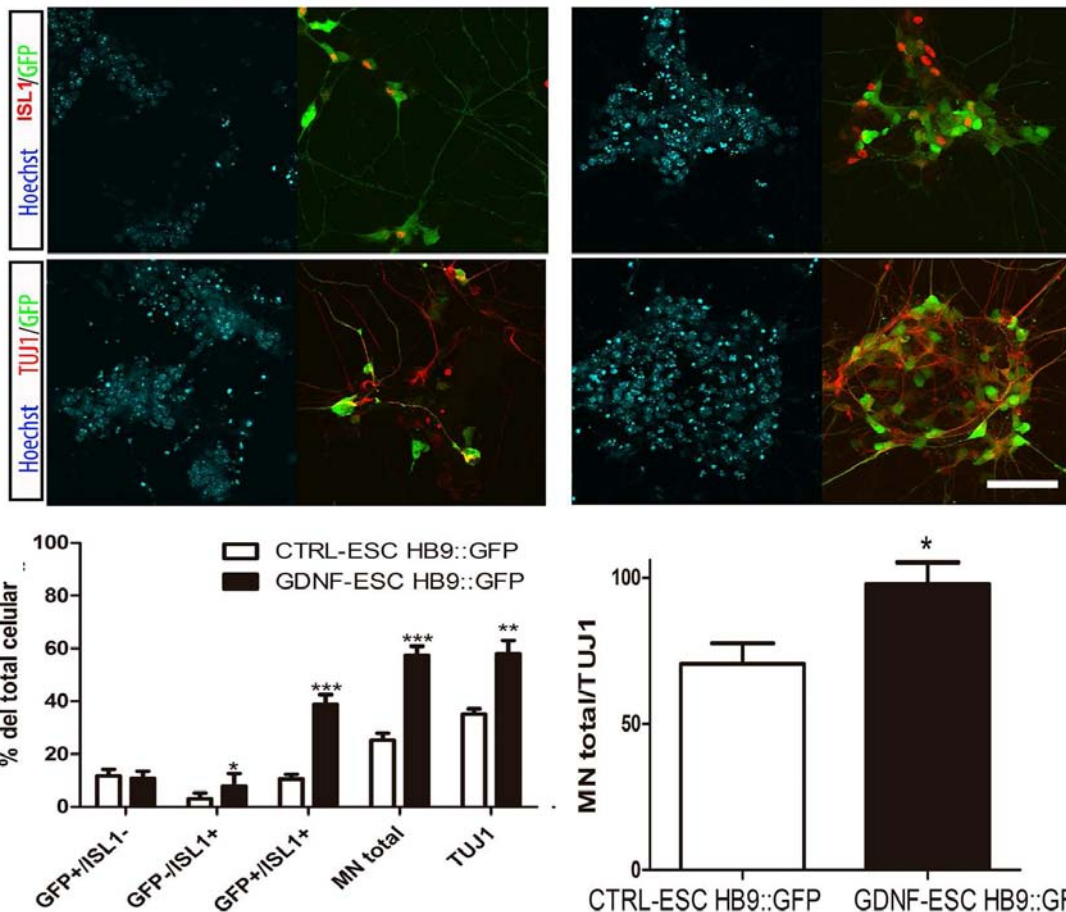


Fig. 23. Las GDNF-ESC HB9::GFP producen un mayor número MN postmitóticas Inmuntinción de neuronas postmitóticas para Isl1 y GFP (marcadores de MN) y para TUJ1 (marcador neuronal). Cuantificación de los marcadores indicados en los cultivos de diferenciación. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$. Datos obtenidos de 4 experimentos por duplicado. Aumento 60X.

específicamente a las células positivas para Olig2; es decir, precursores de MNs (Fig. 22).

Para evaluar la eficiencia en la diferenciación de MN postmitóticas los EB se disociaron y resembraron. *Isl1* (*Isl1*) es un factor transcripcional que debe aparecer temprano durante la adquisición del fenotipo de MN y junto con HB9, estos son considerados marcadores pan-motoneuronales [41]. Analizamos estos marcadores mediante tinciones para *Isl1* y el reportero HB9::GFP; así como con el anticuerpo TUJ1 que reconoce la tubulina beta III de clase neuronal asociado a todos los tipos de neuronas. Encontramos que las células GFP+/*Isl1*- no cambian en ninguna de las dos condiciones. Sin embargo, incrementos significativos se observaron para células GFP-/*Isl1*+ y para GFP+/*Isl1*+ en presencia de GDNF. Respecto al total de MNs un incremento de 2.3 veces en cultivos de GDNF-ESC/HB9::GFP fue observado. Considerando cambios en el número de neuronas, GDNF incrementó el número total de ellas, lo cual parece más bien deberse al aumento de la subpoblación de MNs (Fig. 23). Más importante aún, prácticamente todas las neuronas presentes en los cultivos de GDNF-ESC/HB9::GFP presentan un fenotipo de MNs basado en la expresión ya sea de GFP o *Isl1*, mientras que en los cultivos controles la proporción que correspondía a otro tipo diferente de neuronas diferente de las MNs es alrededor de 30% (Fig. 23).

LA ADICIÓN TEMPRANA DE GDNF FAVORECE LA DIFERENCIACIÓN DE MNs

Para determinar si GDNF es necesario durante todo el proceso de diferenciación o este solo se requiere en un periodo específico, decidimos utilizar las células CTRL-ESC HB9::GFP sin agregar (Fig. 24A) y al agregar GDNF humano recombinante (rhGDNF) durante ventanas de tiempo específicas; esto es: antes de la diferenciación en el estado pluripotencial (Fig. 24B), a lo largo de los 6 días de diferenciación en EBs (Fig. 24C) o al final de la diferenciación en neuronas postmitóticas (Fig. 24D). Aunque en cada una de las etapas analizadas hubo un aumento en adquisición de un fenotipo de MN respecto al control; únicamente en la adición de GDNF durante el estado indiferenciado se observó un incremento estadísticamente significativo (Fig. 24E); sin embargo, este aumento no alcanza los valores que se obtienen con la presencia continua del GDNF durante toda la diferenciación con la expresión transgénica de GDNF lo cual sugiere que este factor trófico es necesario durante todas las etapas para obtener su máxima eficacia de inducción a MN. Para corroborar el efecto en la diferenciación de las MNs, decidimos agregar un anticuerpo neutralizante para GDNF (4 µg/ml) desde el estado indiferenciado hasta 2 días de EBs, periodo donde se observó un mayor efecto de GDNF (Fig. 24F). Al co-incubar anticuerpo y rhGDNF el efecto de este último se abate totalmente. El anticuerpo neutralizante sólo no posee ningún efecto en la diferenciación a MNs (Fig. 24F). Todo lo anterior corrobora el efecto temprano que posee GDNF durante la diferenciación de las MN a partir de estados indiferenciados de las ESC.

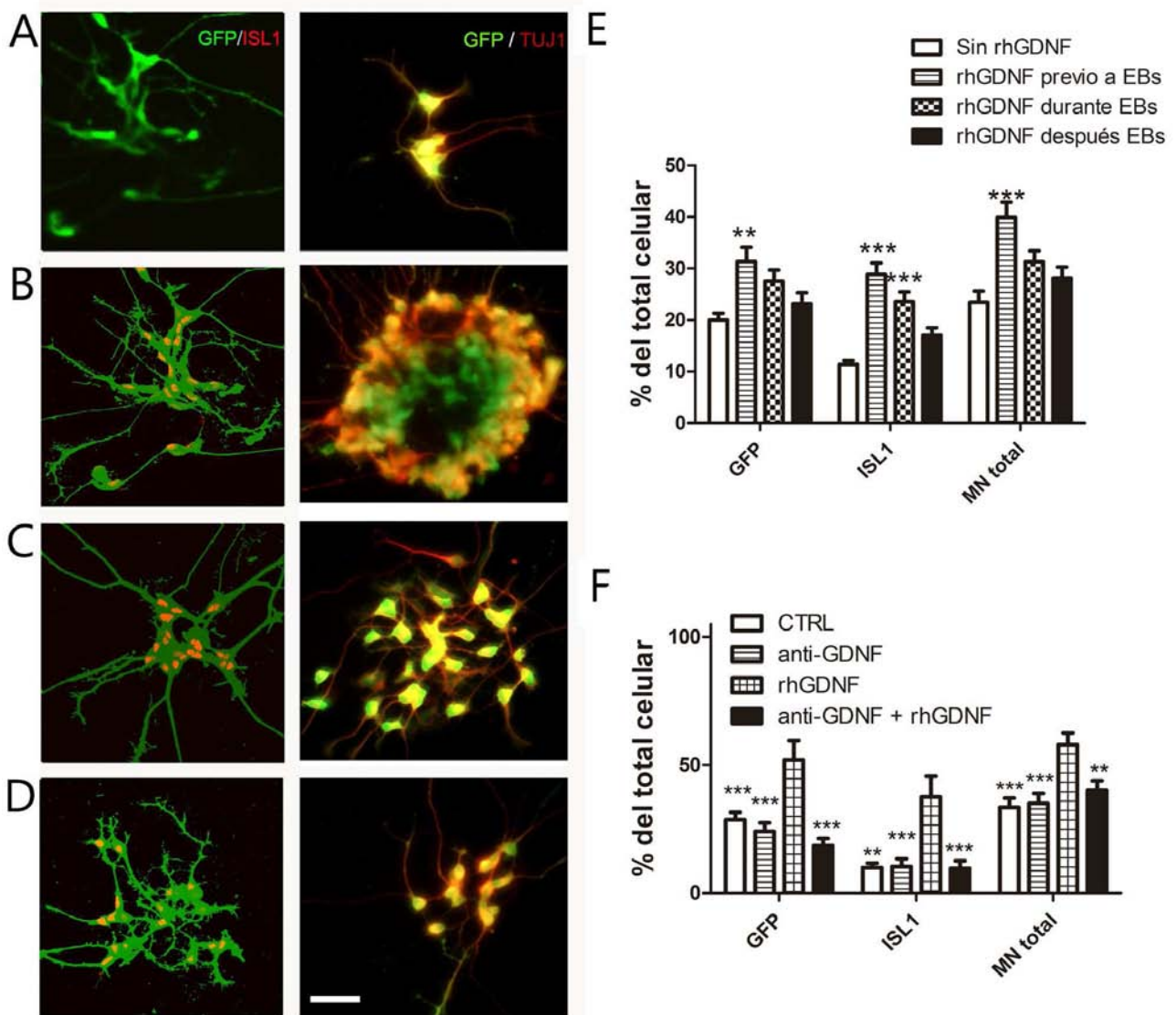


Fig. 24. rhGDNF agregado en etapas tempranas de la diferenciación aumenta la obtención de MN, CTRL-ESC/HB9::GFP fueron diferenciadas sin rhGDNF (A) o al agregar esta proteína en periodos específicos de la diferenciación : previo a la formación de EBs (B); durante los EBs (C) o después de los EBs (D). E) Gráfica del número de MNs obtenidas de acuerdo a los marcadores independientes de ISL1, HB9:GFP o totales; en F) la adición del anticuerpo neutralizante abole el efecto de rhGDNF. En E ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ comparado vs la diferenciación sin rhGDNF y en F vs la adición de rhGDNF. Barra de escala: 50 μm .

LA SOBREEXPRESIÓN DE GDNF INCREMENTA LA EXCITABILIDAD DE LAS MNS DERIVADAS DE LAS ESC.

Las propiedades electrofisiológicas de 4 líneas de ESC (dos CTRL-ESC HB9::GFP y dos GDNF-ESC HB9::GFP) fueron estudiadas después de ser diferenciadas a MNs y ser identificadas por su marca de GFP. Current-clamp y voltage-clamp de

célula completa fueron realizados para estudiar las curvas de corriente-voltaje (datos no mostrados) y obtener las propiedades pasivas de membrana. Dado que nuestro interés es estudiar la excitabilidad en varios estados de maduración, solo las corrientes o voltajes en respuesta a las inyecciones de corriente o comandos de voltaje son mostrados.

La figura 25 muestra que a los 9 días de cultivo tanto en muestras de CTRL-ESC HB9::GFP (columna de la izquierda) y GDNF-ESC/HB9::GFP (columna de la derecha) muestra varios estados de diferenciación de las MNs: desde respuestas locales (Fig. 25A, 25B, cabezas de flecha) eventos regenerativos de sodio-calcio que se sabe aparecen durante la diferenciación de las MNs [43] (Fig. 25C, 25D flechas), hasta disparos repetitivos con un componente principal de sodio. Estas respuestas se obtuvieron con pasos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes (no mostrados) que se inyectan intracelularmente (materiales y métodos). En las MNs que sobreexpresan GDNF, potenciales de acción más estrechos (menores a 2 ms), de mayor amplitud y más frecuentes aparecían al ser evocados (Fig. 25E y 25F) respecto a la condición control. De la misma manera, la sobreexpresión de GDNF facilitó la aparición de mayores rectificaciones entrantes evidenciadas por la aparición de “sag” tras la hiperpolarización (flecha de sag en Fig. 5F); así como potenciales de acción de rebote (RAPs) al término de la hiperpolarización (flecha de RAP en Fig. 25F).

La proporción de neuronas que mostraba signos de excitabilidad fue mayor en el tratamiento con GDNF, en particular, la presencia de potenciales de acción fue 2.3 veces más frecuente que en la condición control (Fig. 25G). Aunque el potencial de membrana en reposo no fue diferente entre ambas muestras (Fig. 25H), el 75% de la población que sobreexpresaba GDNF se encontraba debajo del promedio de los casos control marcando una tendencia. De manera similar, no hubo diferencias significativas en la resistencia de entrada en neuronas completas (R_N), aunque la distribución de las resistencias en la población de las GDNF-ESC HB9::GFP fue más compacta (Fig. 25I).

Adicionalmente, al buscar otros signos de madurez excitatoria en las MNs [43, 44] se observó que el número de neuronas que mostraba rectificación entrante tipo “sag” fue significativamente mayor en las células que expresan GDNF (Fig. 25J). Lo mismo ocurrió para los RAPs después de la hiperpolarización (Fig. 25K). Aunque la presencia de eventos regenerativos mezclados de sodio-calcio fueron de igual número en ambos casos (Fig. 25L), los eventos de calcio en las GDNF-ESC HB9::GFP poseían una mayor duración y con más potenciales despolarizantes (Fig. 25C y 25D)

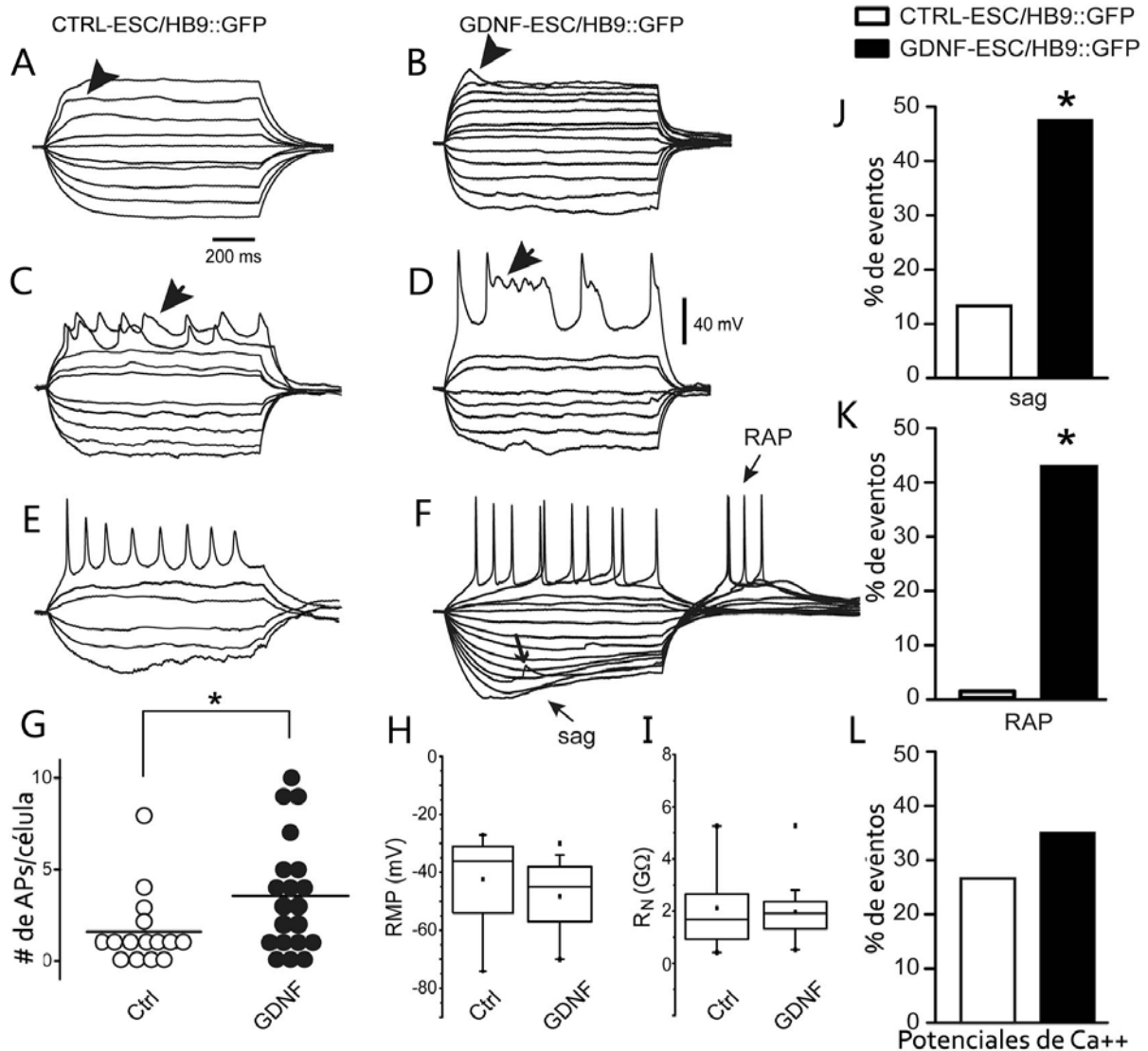


Fig. 25. Signos de excitabilidad presentes en las MNs derivadas de la células control y que sobreexpresan GDNF. A los 9 días en cultivo, ambas líneas celulares CTRL-ESC/HB9::GFP (columna izquierda) y GDNF-ESC/HB9::GFP (columna media) mostraron varios estados de diferenciación. A-F muestran respuestas de voltaje a pasos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes (no mostrados) inyectados intracelularmente. A, B) cabezas de flecha denotan respuestas locales que aparecen en ambas clases de neuronas. C, D) flechas denotan respuestas regenerativas con respuestas de sodio-calcio mezcladas. E, F) Disparos repetidos de potenciales de acción en ambas clases de neuronas. En la sobreexpresión de GDNF, aparecen potenciales de acción más frecuentes, de mayor amplitud y más compactos. GDNF muestra mayores rectificaciones entrantes tipo “sag” y RAPs. Flechas muestran un evento sináptico espontaneo putativo (F). G) El promedio de potenciales de acción (APs) fue mayor al sobreexpresar GDNF. H, I) Ni el potencial de membrana en reposo ni la resistencia de membrana fueron diferentes en ambos casos aunque una distribución más compacta se observó en las que sobreexpresan GDNF. J) El porcentaje de neuronas que mostraron “sag” fue mayor en las GDNF-ESC/HB9::GFP. K) El porcentaje de neuronas que mostraron RAPs fue mayor en las GDNF-ESC/HB9::GFP. L) El porcentaje de eventos de calcio no fue

significativamente diferente aunque en las neuronas que sobreexpresan GDNF estos potenciales fueron en mayor número y de mayor duración. (C y D).

Curvas de intensidad-frecuencia muestran que la inyección de corriente genera APs en MNs derivadas tanto de CTRL- como en GDNF-ESC HB9::GFP. Sin embargo, estas frecuencias fueron de mayor número en las neuronas que sobreexpresan GDNF. En este respecto, no solo las frecuencias aumentaron en las GDNF-ESC HB9::GFP sino que incluso pudo administrarse corriente a mayor intensidad sin signos de inactivación de espigas como sucedió en las CTRL-ESC HB9::GFP que tras aplicaciones de 40 o más pA aparecía la inactivación de espigas (Fig. 26).

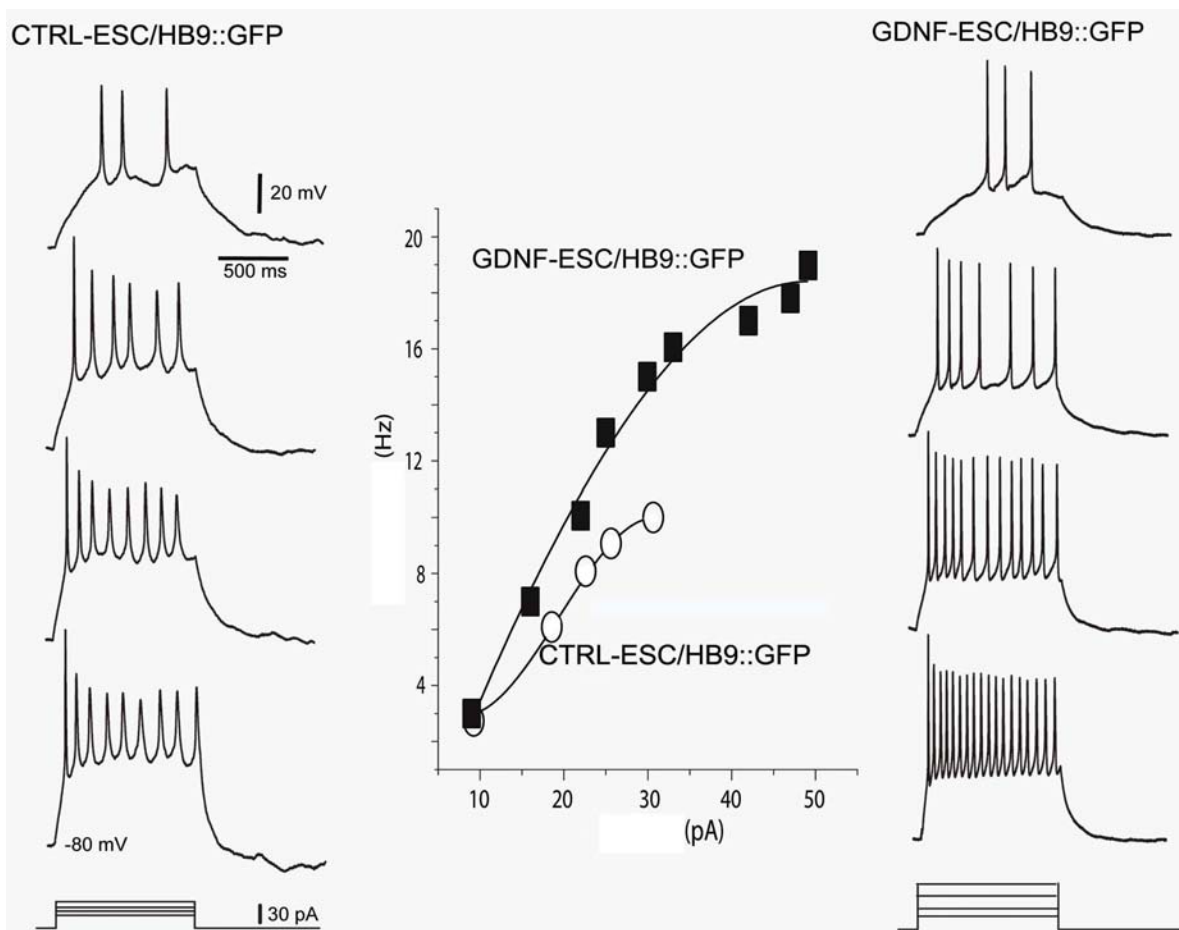


Fig. 26 Gráfica de intensidad vs frecuencia muestra un incremento en la frecuencia de disparo en las MN GDNF-ESC/HB9::GFP. Columna izquierda. De arriba a abajo cuatro respuestas evocadas representativas con inyección de corriente intracelular de intensidad creciente en las neuronas Ctrl-ESC/HB9::GFP (círculos blancos) altas intensidades provocan un cese de disparo. Columna de la derecha misma situación para las neuronas GDNF (GDNF-ESC/HB9::GFP) (cuadros negros) mayores frecuencias pueden alcanzarse sin mostrar signos de inactivación. Múltiples

tratamientos fueron comparados con Anova Kruskal-Wallis y Dunn como prueba *post hoc*.

En la figura 27 se muestran algunos signos de excitabilidad solo encontrados en las GDNF-ESC HB9::GFP como son, potenciales sinápticos despolarizantes e hiperpolarizantes espontáneos putativos. (Fig. 27A) disparos espontáneos de potenciales de acción a corriente cero (Fig. 27B), corrientes incipientes dependientes de voltaje entrantes y salientes lo que sugiere que se encuentran en desarrollo (Fig. 27C). Una vez que las MNs mostraron corrientes de acción, las células presentaban disparos repetidos y era común observar adaptación de la frecuencia de espigas: el primer espacio interespiga era más estrecho que el último en el tren de disparos (flechas de dos cabezas en la Fig. 27D). Además, en los casos que se logró evocar disparos repetitivos, éstos eran bloqueados completamente por tetrodotoxina (TTX) lo que confirma que estos potenciales de acción se debían a canales de sodio sensibles a TTX (Fig. 27E y 26F, misma célula). Otros signos de madurez fueron encontrados: disparos repetidos principalmente por potenciales de acción dependientes de sodio, adaptación de la frecuencia de espiga, rectificación entrante tipo “sag” y RAPs. (Fig. 27G). Células en estados intermedios presentaron potenciales de acción como eventos regenerativos de sodio-calcio mezclados [43]. TTX bloqueó el componente rápido de sodio mientras que 100 μM de Ni^{2+} bloqueó la despolarización tipo meseta de componente lento (Fig. 27H). Después de la aplicación de TTX y Ni^{2+} , la aplicación de más corriente no pudo evocar ningún signo de excitabilidad lo que sugiere que las corrientes de sodio y calcio que aparecen durante esta etapa intermedia se encuentran presentes [43].

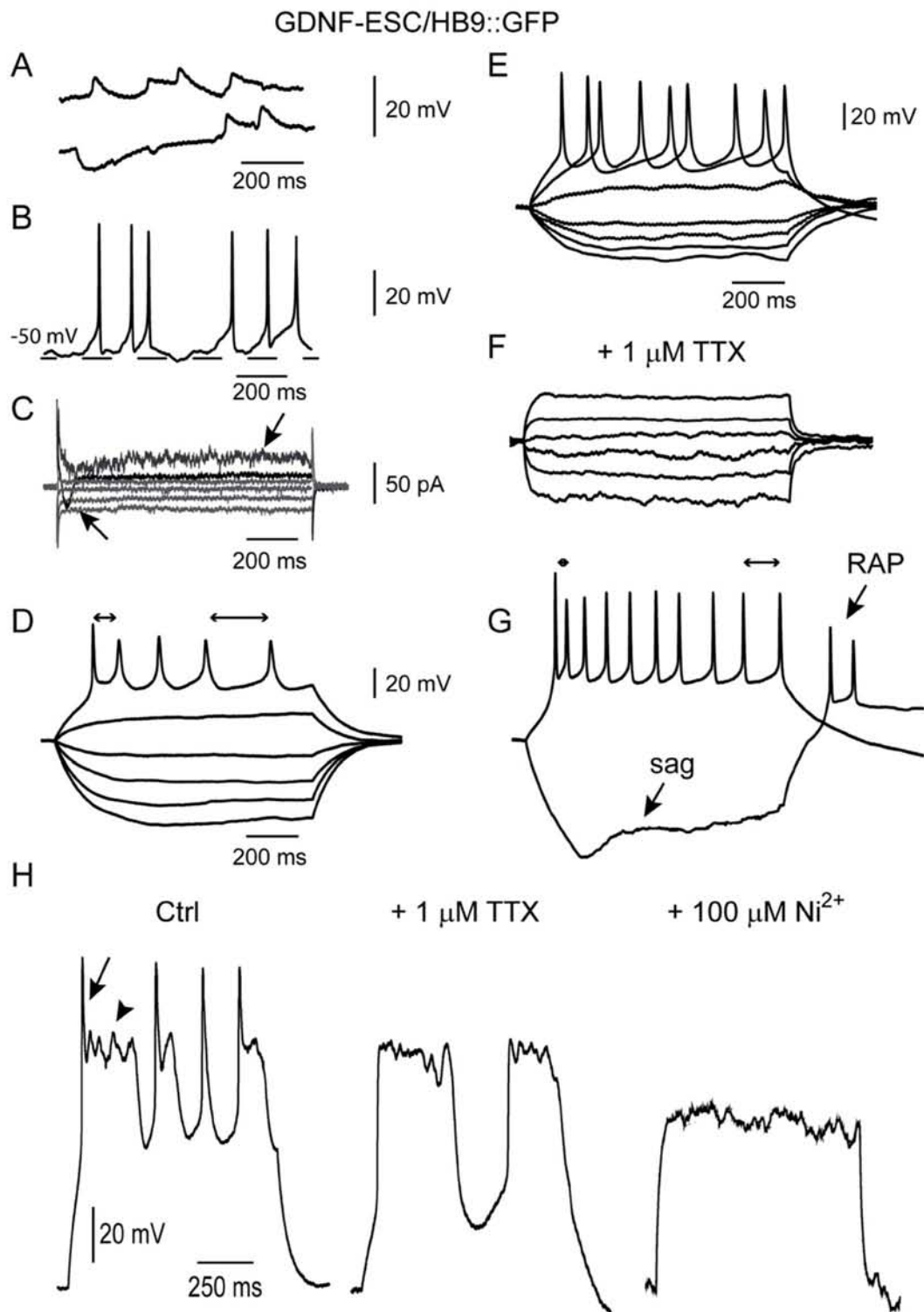


Fig. 27. Signos de excitabilidad son más frecuentemente encontrados en las MNs GDNF-ESC/HB9::GFP. A) eventos sinápticos despolarizantes e hiperpolarizantes putativos. B) eventos sinápticos putativo pueden provocar el disparo de otros

potenciales de acción. C) Voltage-clamp somático puntual frecuentemente mostraba corrientes entrantes incipientes (flecha apuntando hacia arriba) o corrientes de acción no pinzadas (no mostradas). Signos incipientes o rectificación tardía en desarrollo fueron también observadas (flecha apuntando hacia abajo). Los comandos de voltaje no están ilustrados. D) Disparos repetidos de potenciales de acción así como adaptación (flechas bidireccionales). E, F) Potenciales de acción que pueden ser bloqueados con TTX 1 μ M (F). G) Una MN con más signos de maduración mostrando, varios potenciales de acción, adaptación, “sag” (flecha inferior) y RAPs (flecha superior). H) Eventos propagados repetitivos y regenerativos en una neurona al ser evocados. Flecha denota una corriente putativa de sodio y la cabeza de flecha una meseta de calcio. Control (izquierda); después de agregar TTX, espigas de sodio desaparecen dejando solo los potenciales de calcio, que también son bloqueados (derecha).

LAS MNS DERIVADAS DE LAS GDNF-ESC/HB9::GFP SON MÁS RESISTENTES A LA EXCITOTOXICIDAD POR KAINATO.

Las MNs son susceptibles a una gran variedad de agentes lesivos como son el estrés oxidativo [122], la disminución de pozas energéticas [123], y la excitotoxicidad [124]. En el último caso, glutamato o sus agonistas AMPA o kainato han sido usados para inducir degeneración de las MNs. Neuronas postmitóticas disociadas fueron incubadas con kainato por 15 minutos para evaluar la muerte por excitotoxicidad y el efecto de GDNF sobre las MNs. Después de 24 horas de iniciado el tratamiento, las MNs control se redujeron en número en un 71%, mientras que las que expresaban GDNF solo disminuyeron un 27%. La supervivencia de las MNs GFP+, Isl1+ y el total de las MNs fue mayor con la sobreexpresión del factor trófico comparado con el control (Fig. 28).

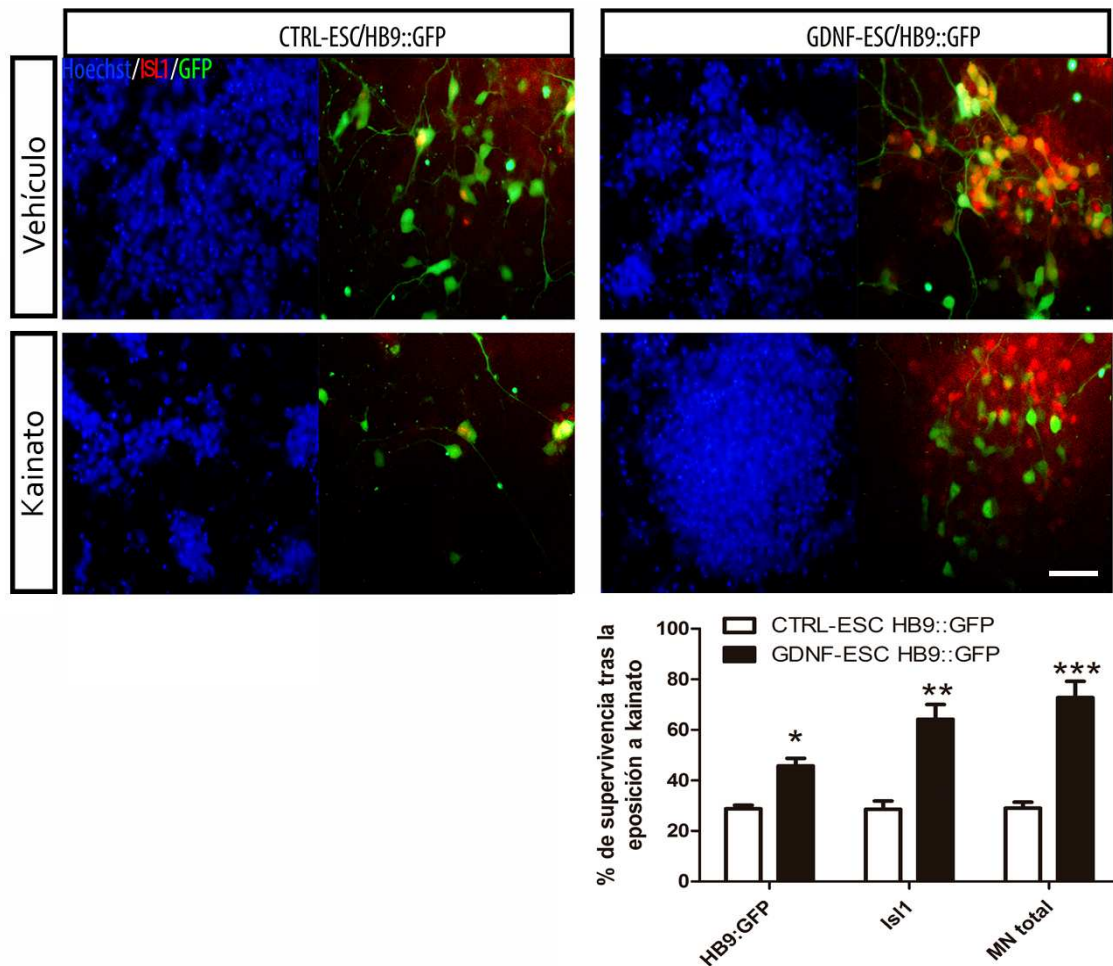


Fig. 27. MNs derivadas de ESC son protegidas por la expresión de GDNF ante la excitotoxicidad del kainato. Promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Aumento de 60x. La cuantificación de Isl1+, GFP+ o MNs totales se encuentra graficada. * $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$**

DISCUSIÓN

En este trabajo se establecieron líneas estables de ESC que secretan GDNF. Este tipo de acercamiento nos permitió mostrar que la sobreexpresión de GDNF 1) incrementa la diferenciación dopaminérgica hacia NDA del subtipo del cerebro medio; 2) descubrir que en EBs, induce la proliferación lo que resulta en más precursores de MNs; 3) y este fenómeno se observa desde etapas tempranas del desarrollo; 4) que favorece la diferenciación terminal a MNs; 5) que induce la

maduración electrofisiológica y que; 6) ofrece una mayor protección al daño por neurotóxicos tanto en NDAs como en MNs. Es importante hacer notar que en la mayoría de los efectos encontrados en este trabajo, el GDNF autocrino fue el único factor neurotrófico utilizado sin la adición de ningún otro al medio o mediante co-cultivos con algún tipo de célula que de soporte trófico por moléculas solubles o de contacto.

El efecto de GDNF como un factor de supervivencia ha sido ampliamente estudiado y descrito para las NDAs y las MNs. En concordancia con esto, la diferenciación de células troncales pluripotenciales hacia estos linajes siempre ha contenido GDNF como parte de la suplementación del medio; sin embargo, que los precursores neuronales sean o no responsivos a GDNF es aún una pregunta abierta. En caso de ser cierto, GDNF no solo tendría un impacto en la supervivencia sino que aumentaría el compromiso neuronal. En este trabajo, realizamos una transducción de ESC indiferenciadas con un vector lentiviral que constitutivamente expresa hGDNF y en todas las clonas analizadas encontramos que preservaban la expresión de marcadores asociados a pluripotencia. Las GDNF-ESC/HB9::GFP fueron diferenciadas a NDAs resultando en un mayor número de neuronas TH+ que en las controles. Además, el fenotipo característico de cerebro medio se incrementó de acuerdo a marcadores como son Lmx1b, FoxA2, y Girk2 y Calb. Un posible mecanismo para este fenómeno podría incluir la sobreexpresión del homólogo de Delta-like 1 (Dlk1), dado que la inyección de virus que expresan GDNF en el estriado de roedores adultos incrementa 4 veces la expresión de Dlk1 en el cerebro medio; a su vez, DLk1 se expresa en el cerebro medio ventral de ratones en desarrollo y su sobreexpresión en células humanas favorece la expresión de TH [125]. Esto sugiere que GDNF podría estar favoreciendo el compromiso de neuronas hacia un fenotipo específico y no solo incrementando la supervivencia de las neuronas. Esta misma pregunta podría ser realizada para otros factores neurotróficos importantes para la diferenciación dopaminérgica [126].

Las NDAs derivadas de la línea GDNF-ESC/HB9::GFP como era de esperarse fueron más resistentes al daño ocasionado por la 6-OHDA pues GDNF fue inicialmente caracterizado como una molécula protectora para las NDAs [79]. *In vitro*, esta neuroprotección ha sido observada cuando GDNF es agregado al medio [84] o cuando se realizan co-cultivos con células que secretan GDNF [101, 127]. El tener un cultivo diferenciado de neuronas que incluyan a las NDAs y secreten GDNF les podría proporcionar una mayor tasa de supervivencia después de ser implantadas, especialmente en modelos animales de la enfermedad de Parkinson. La propiedad de autoliberación de GDNF de estas neuronas podría ser ventajosa para incrementar la supervivencia de NDA en trasplantes así como otras células responsivas a GDNF como son las MNs.

Durante el desarrollo de la médula espinal, se ha estudiado que tanto en el ratón como en el pollo, los precursores de MNs, proliferan para generar MNs y posteriormente oligodendrocitos. De manera paralela, GDNF y sus receptores son expresados en estas zonas de proliferación y por tanto resulta factible que GDNF tenga efectos adicionales a la supervivencia neuronal [102-105]. En este trabajo describimos un aumento en la proliferación que es específico de los precursores

de MNs en los cultivos de GDNF-ESC/HB9::GFP. Se ha demostrado que Olig2 mantiene a los precursores de MN ciclando al antagonizar los efectos proneuronales de Ngn2. Este efecto abole la expresión de genes neurales incluido factores transcripcionales específicos de MNs como es HB9 [120]. En concordancia, los cultivos GDNF-ESC/HB9::GFP, al sobreexpresar GDNF poseían un mayor número de precursores de MN en mitosis lo que impedía la aparición temprana de la HB9:GFP; ya que en estos cultivos, una disminución pequeña pero significativa de la GFP bajo el promotor HB9 fue observada al día 5 de proliferación de los EBs. Un estudio reciente demostró que un coctel de factores neurotróficos que incluyen GDNF incrementa la presencia de células BrdU positivas, y por tanto aumentando el número total de MNs pero sin alterar el porcentaje de MN obtenidas a partir de hESC [128]. Es importante notar que GDNF tiene efectos tempranos incluso en estadios pluripotenciales de las células troncales y que podrían estar “condicionando” las células a cierto linaje y que se traduce en un mayor número de MN al final de la diferenciación. El bloqueo mediante anticuerpos neutralizantes de GDNF sugiere también una acción mediada a través de receptores de membrana.

Respecto a la diferenciación, encontramos que GDNF favorece el número de MNs aunque algunas subpoblaciones parecen verse favorecidas dado que las GFP-/Isl1+ y las GFP+/Isl1+ aumentaron respecto al control; en cambio, las GFP+/Isl1- no sufrieron cambios. El aumento significativo de las células TUJ1 puede estar ocasionado por un aumento en la diferenciación de las MNs después de la expansión de los precursores en presencia de GDNF. Un aspecto importante es que en los cultivos GDNF-ESC/HB9::GFP prácticamente todas las neuronas poseen algún marcador de MNs lo cual puede ser explicado por alguna de dos razones: 1) GDNF especifica las células que se encuentran en proceso de diferenciación para así convertirse en MN; por ejemplo, GDNF es necesario para la especificación de neuronas del ganglio de la raíz dorsal [129], o; 2) las células que no responden a GDNF mueren debido a la falta de soporte trófico dejando así, un cultivo enriquecido en MNs. Ambas posibilidades no son mutuamente excluyentes. Es bien conocido que *in vivo* no todas las MN responden igualmente a alteraciones en la señalización de GDNF. Los ratones KO para GDNF presentan un disminuido número de núcleos de MN espinales y faciales [89]; contrariamente, la expresión específica de GDNF altera el número de MN y las uniones neuromusculares pero no en todos los núcleos [130].

Registros electrofisiológicos realizados en este trabajo muestran signos de excitabilidad diversos pese a corresponder a neuronas con el mismo número de días de diferenciación *in vitro* (9 días). Por tanto, células con respuestas locales incipientes hasta células con disparos repetitivos, adaptación de frecuencia, rectificación entrante tipo “sag” y RAP se observaron [44]. Además estados intermedios de madurez excitatoria como son potenciales mezclados de sodio-calcio se observaron [43]. Las corrientes de sodio fueron bloqueadas por TTX mientras que los eventos de calcio fueron bloqueados con níquel. De igual manera, muchos de estos signos de excitabilidad fueron más pronunciados o presentaban menor variabilidad en los registros al sobreexpresar GDNF. En resumen, en la misma ventana temporal estudiada se pueden encontrar varios

estadios de diferenciación en todas las clonas registradas; sin embargo, con la sobreexpresión de GDNF, más signos de madurez y menor variabilidad puede encontrarse.

Se ha mostrado que GDNF puede modular la excitabilidad crónica y aguda a través de la regulación de canales iónicos. En NDA mesencefálicas, GDNF activa MAP cinasas lo que resulta en la inactivación de corrientes de potasio tipo A y finalmente un incremento en la excitabilidad [131]. En el ganglio de la raíz dorsal, el tratamiento de GDNF después de la sección de un nervio promueve la expresión de RNA mensajero de los canales de calcio así como la conductancia de sodio [132]. En neuronas entéricas, GDNF incrementa la expresión de 5-HT_{3a} al inhibir al rectificador entrante tardío de potasio [133]. En nuestros experimentos, también mostramos que GDNF puede incrementar la excitabilidad de las MN derivadas de ESC al incrementar la frecuencia de disparo. Los mecanismos por los cuales GDNF ejerce esta acción e las MN podrían ser similares a las reportadas; sin embargo, los mecanismos deben ser estudiados.

Recientemente, líneas de ESC que constitutivamente expresan GDNF fueron reportadas. Estas células fueron diferenciadas a MNs donde mostraron un incremento en la supervivencia y en la madurez electrofisiológica. Es importante mencionar que en este trabajo la maduración electrofisiológica y la supervivencia por periodos prolongados en cultivo solo se logró realizando cocultivos que dieron soporte a las MNs diferenciadas. De hecho, la gran mayoría de los trabajos que buscan favorecer la maduración neuronal se realizan en cocultivo con astrocitos, neuronas u otras células de soporte como miocitos. Nuestro trabajo muestra que GDNF por sí mismo y sin la adición de ningún otro factor o linaje celular es capaz de favorecer la maduración neuronal. Este y otros protocolos de diferenciación, incluido el que nosotros utilizamos, produce además de MNs otras células dentro de las cuales se cuentan los astrocitos. Sería importante aislar las MNs que secretan GDNF y cultivar estas células sin ningún otro tipo celular, para establecer si la supervivencia y la maduración es potenciada solamente por GDNF en esta condición. En nuestras líneas celulares, GDNF no interfiere en los programas de pluripotencia, dado que estas líneas fueron capaces de producir MNs y astrocitos mientras que factores transcripcionales asociados a pluripotencia están siendo expresados en estas líneas. La neuroprotección conferida por GDNF sobre las MNs al igual que en las NDA podría favorecer su supervivencia después del trasplante. De hecho, las MNs que sobreexpresan GDNF han sido trasplantadas en un modelo de lesión de nervio ciático donde sobreviven hasta 35 días y promueven la reinervación del músculo diana [94].

Estas líneas de GDNF-ESC resuelven dos problemas a la vez, proveer GDNF durante la diferenciación y la maduración de neuronas, y si estas neuronas se planea sean usadas para implante, proveen un constante aporte de este factor por secreción autocrina; sin embargo, esta eficiencia aún debe ser probada en modelos animales. A pesar de las similitudes entre las ESC de ratón y las de humano, las diferencias inherentes a cada especie requieren de la replicación de estos experimentos en las ESC de humanos y que puedan arrojar luz en el papel de GDNF en el desarrollo neuronal humano. Producir células que regulen la

secreción de GDNF para evitar efectos pleiotrópico es otra meta deseable en la cual también ya nos encontramos trabajando.

CONCLUSIÓN

GDNF es una molécula con gran valor biológico y terapéutico para las NDAs y las MNs y que puede ser insertada para su expresión de manera estable en ESC pues permite la manutención en un estado indiferenciado de las ESC o si se desea, diferenciarlas de manera robusta a NDAs y/o MNs con un grado alto de maduración. Por tanto, se puede concluir que GDNF posee un papel importante durante el desarrollo embrionario de las NDA y MN al permitir aumentar el número de precursores y su diferenciación terminal; además, este factor puede ser utilizado desde etapas tempranas de diferenciación *in vitro* y no solo al final como regularmente se utiliza y así promover una mayor diferenciación hacia estos linajes neuronales.

PERSPECTIVAS

Se sabe que el trasplante de neuronas dopaminérgicas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, una gran cantidad de estas neuronas mueren, alrededor del 80 a 95%; por lo que la generación de neuronas resistentes que sobreexpresen un factor de resistencia como es el GDNF debe conferir alguna ventaja para la supervivencia durante el trasplante; por tanto estamos interesados en probar estas células en modelos animales de esta enfermedad y analizar una mayor supervivencia del trasplante que derive en un mejora conductual.

En relación a las MNs se sabe que el blanco de sus axones son las fibras musculares. Además desde etapas tempranas durante la formación de los miocitos se empieza a expresar GDNF, por lo que estamos interesados en estudiar el papel que posee este factor trófico en el crecimiento dirigido de los axones de las MNs y la formación de la placa neuromuscular. Por lo anterior se están realizando estudios de sobreexpresión inducible de este factor en células que se diferencian a miocitos y se está analizando el efecto que posee sobre las MNs

REFERENCIAS

1. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2014:xiii, 506 p.
2. Lamb TM, Knecht AK, Smith WC et al. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. **Science**. 1993;262:713-718.
3. Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. **Cell**. 1994;77:283-295.
4. Godsave SF, Slack JM. Clonal analysis of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. **Developmental biology**. 1989;134:486-490.
5. Sanes DH, Reh TA, Harris WA. Development of the nervous system. 3rd ed. Amsterdam ; Boston, MA: Academic Press,; 2012:xvi, 341 p.
6. Stuart JJ, Brown SJ, Beeman RW et al. The *Tribolium* homeotic gene Abdominal is homologous to abdominal-A of the *Drosophila* bithorax complex. **Development**. 1993;117:233-243.
7. Gavalas A, Ruhrberg C, Livet J et al. Neuronal defects in the hindbrain of *Hoxa1*, *Hoxb1* and *Hoxb2* mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. **Development**. 2003;130:5663-5679.
8. Simeone A, Acampora D, Nigro V et al. Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. **Mechanisms of development**. 1991;33:215-227.
9. Chambon P. The molecular and genetic dissection of the retinoid signaling pathway. **Recent progress in hormone research**. 1995;50:317-332.
10. Joyner AL, Liu A, Millet S. *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. **Current opinion in cell biology**. 2000;12:736-741.
11. Danielian PS, McMahon AP. *Engrailed-1* as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. **Nature**. 1996;383:332-334.
12. Zhong SC, Chen XS, Cai QY et al. Dynamic expression and heterogeneous intracellular location of *En-1* during late mouse embryonic development. **Cells, tissues, organs**. 2010;191:289-300.
13. Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and FLP-mediated recombination. **Nature genetics**. 1998;18:136-141.
14. Schwarz M, Alvarez-Bolado G, Urbanek P et al. Conserved biological function between *Pax-2* and *Pax-5* in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1997;94:14518-14523.
15. Ono Y, Nakatani T, Minaki Y et al. The basic helix-loop-helix transcription factor *Nato3* controls neurogenic activity in mesencephalic floor plate cells. **Development**. 2010;137:1897-1906.
16. Reifers F, Bohli H, Walsh EC et al. *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. **Development**. 1998;125:2381-2395.
17. Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL et al. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. **Cell**. 1998;93:755-766.
18. Lahti L, Peltopuro P, Piepponen TP et al. Cell-autonomous FGF signaling regulates anteroposterior patterning and neuronal differentiation in the mesodiencephalic dopaminergic progenitor domain. **Development**. 2012;139:894-905.

19. Alavian KN, Scholz C, Simon HH. Transcriptional regulation of mesencephalic dopaminergic neurons: the full circle of life and death. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**. 2008;23:319-328.
20. Chakrabarty K, Von Oerthel L, Hellemons A et al. Genome wide expression profiling of the mesodiencephalic region identifies novel factors involved in early and late dopaminergic development. **Biology open**. 2012;1:693-704.
21. Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keefe GW. Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. **Developmental biology**. 2013;379:123-138.
22. Zou HL, Su CJ, Shi M et al. Expression of the LIM-homeodomain gene Lmx1a in the postnatal mouse central nervous system. **Brain research bulletin**. 2009;78:306-312.
23. Chung S, Leung A, Han BS et al. Wnt1-lmx1a forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the SHH-FoxA2 pathway. **Cell stem cell**. 2009;5:646-658.
24. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. **Cell**. 1993;75:1417-1430.
25. Wilkinson DG, Bailes JA, McMahon AP. Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. **Cell**. 1987;50:79-88.
26. Adams KA, Maida JM, Golden JA et al. The transcription factor Lmx1b maintains Wnt1 expression within the isthmus organizer. **Development**. 2000;127:1857-1867.
27. Yan CH, Levesque M, Claxton S et al. Lmx1a and Lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2011;31:12413-12425.
28. Joksimovic M, Yun BA, Kittappa R et al. Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. **Nature neuroscience**. 2009;12:125-131.
29. Gates MA, Torres EM, White A et al. Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. **The European journal of neuroscience**. 2006;23:1384-1390.
30. Peng C, Aron L, Klein R et al. Pitx3 is a critical mediator of GDNF-induced BDNF expression in nigrostriatal dopaminergic neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2011;31:12802-12815.
31. Maxwell SL, Ho HY, Kuehner E et al. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. **Developmental biology**. 2005;282:467-479.
32. Jacobs FM, Smits SM, Noorlander CW et al. Retinoic acid counteracts developmental defects in the substantia nigra caused by Pitx3 deficiency. **Development**. 2007;134:2673-2684.
33. Simeone A, Di Salvio M, Di Giovannantonio LG et al. The role of otx2 in adult mesencephalic-diencephalic dopaminergic neurons. **Molecular neurobiology**. 2011;43:107-113.
34. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Nature reviews Neuroscience**. 2007;8:755-765.
35. Horton C, Maden M. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**. 1995;202:312-323.
36. Alaynick WA, Jessell TM, Pfaff SL. SnapShot: spinal cord development. **Cell**. 2011;146:178-178 e171.

37. Novitsch BG, Chen AI, Jessell TM. Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. **Neuron**. 2001;31:773-789.
38. Dasen JS, Liu JP, Jessell TM. Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. **Nature**. 2003;425:926-933.
39. Jungbluth S, Bell E, Lumsden A. Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. **Development**. 1999;126:2751-2758.
40. Liu JP, Laufer E, Jessell TM. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. **Neuron**. 2001;32:997-1012.
41. Amoroso MW, Croft GF, Williams DJ et al. Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2013;33:574-586.
42. Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. Motor neuron diversity in development and disease. **Annual review of neuroscience**. 2010;33:409-440.
43. Spitzer NC, Vincent A, Lautermilch NJ. Differentiation of electrical excitability in motoneurons. **Brain research bulletin**. 2000;53:547-552.
44. Takazawa T, Croft GF, Amoroso MW et al. Maturation of spinal motor neurons derived from human embryonic stem cells. **PLoS one**. 2012;7:e40154.
45. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. **Science**. 1994;266:1062-1064.
46. Springer JE, Seeburger JL, He J et al. cDNA sequence and differential mRNA regulation of two forms of glial cell line-derived neurotrophic factor in Schwann cells and rat skeletal muscle. **Experimental neurology**. 1995;131:47-52.
47. McCulloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. **Nature medicine**. 2005;11:1026-1028.
48. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". **Cell stem cell**. 2007;1:35-38.
49. Lensch MW, Mummery CL. From stealing fire to cellular reprogramming: a scientific history leading to the 2012 Nobel Prize. **Stem cell reports**. 2013;1:5-17.
50. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. **Journal of embryology and experimental morphology**. 1962;10:622-640.
51. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**. 1996;380:64-66.
52. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**. 1998;394:369-374.
53. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**. 1981;292:154-156.
54. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. **Cell**. 1992;70:841-847.
55. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. 1998;282:1145-1147.
56. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. 2006;126:663-676.
57. Tachibana M, Amato P, Sparman M et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. **Cell**. 2013;153:1228-1238.
58. Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. **Annual review of cell and developmental biology**. 2014;30:647-675.

59. Hackett JA, Surani MA. Regulatory Principles of Pluripotency: From the Ground State Up. **Cell stem cell**. 2014;15:416-430.
60. Zhao W, Ji X, Zhang F et al. Embryonic stem cell markers. **Molecules**. 2012;17:6196-6236.
61. Rossant J. Stem cells and early lineage development. **Cell**. 2008;132:527-531.
62. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**. 2008;132:645-660.
63. Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. **Nature**. 2011;476:224-227.
64. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. **Nature protocols**. 2014;9:2329-2340.
65. Lee SH, Lumelsky N, Studer L et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. **Nature biotechnology**. 2000;18:675-679.
66. Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Camacho-Arroyo I et al. Estradiol promotes proliferation of dopaminergic precursors resulting in a higher proportion of dopamine neurons derived from mouse embryonic stem cells. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**. 2009;27:493-500.
67. Kim JY, Koh HC, Lee JY et al. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. **Journal of neurochemistry**. 2003;85:1443-1454.
68. Gale E, Li M. Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. **Molecular brain**. 2008;1:8.
69. Roybon L, Hjalt T, Christophersen NS et al. Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by Lmx1a, Msx1, Ngn2, and Pitx3. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2008;28:3644-3656.
70. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. **Cell**. 2002;110:385-397.
71. Adams KL, Rousso DL, Umbach JA et al. Foxp1-mediated programming of limb-innervating motor neurons from mouse and human embryonic stem cells. **Nature communications**. 2015;6:6778.
72. Devine MJ, Ryten M, Vodicka P et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the alpha-synuclein locus. **Nature communications**. 2011;2:440.
73. Diaz-Martinez NE, Tamariz E, Diaz NF et al. Recovery from experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**. 2013;21:1579-1591.
74. Barker RA, Drouin-Ouellet J, Parmar M. Cell-based therapies for Parkinson disease-past insights and future potential. **Nature reviews Neurology**. 2015;11:492-503.
75. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **Science**. 2006;314:130-133.
76. Renton AE, Majounie E, Waite A et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. **Neuron**. 2011;72:257-268.
77. Devlin AC, Burr K, Borooah S et al. Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. **Nature communications**. 2015;6:5999.
78. Lopez-Gonzalez R, Kunckles P, Velasco I. Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. **Cell transplantation**. 2009;18:1171-1181.

79. Lin LF, Doherty DH, Lile JD et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**. 1993;260:1130-1132.
80. Ibanez CF, Andressoo JO. Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system. **Neurobiology of disease**. 2016.
81. Li L, Cao J, Zhang S et al. NCAM signaling mediates the effects of GDNF on chronic morphine-induced neuroadaptations. **Journal of molecular neuroscience : MN**. 2014;53:580-589.
82. Bourque MJ, Trudeau LE. GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. **The European journal of neuroscience**. 2000;12:3172-3180.
83. Ling ZD, Potter ED, Lipton JW et al. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. **Experimental neurology**. 1998;149:411-423.
84. Meyer M, Matarredona ER, Seiler RW et al. Additive effect of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 on rat fetal nigral explant cultures. **Neuroscience**. 2001;108:273-284.
85. Riaz SS, Theofilopoulos S, Jauniaux E et al. The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. **Brain research Developmental brain research**. 2004;153:39-51.
86. Sun ZH, Lai YL, Li P et al. GDNF augments survival and differentiation of TH-positive neurons in neural progenitor cells. **Cell biology international**. 2004;28:323-325.
87. Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI et al. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. **Nature neuroscience**. 2008;11:755-761.
88. Kopra J, Vilenius C, Grealish S et al. GDNF is not required for catecholaminergic neuron survival in vivo. **Nature neuroscience**. 2015;18:319-322.
89. Moore MW, Klein RD, Farinas I et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. **Nature**. 1996;382:76-79.
90. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. **Nature**. 1996;382:73-76.
91. Wang CY, Yang F, He X et al. Ca²⁺ binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca²⁺ channels and transmitter release. **Neuron**. 2001;32:99-112.
92. Wang CY, Yang F, He XP et al. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. **The Journal of biological chemistry**. 2002;277:10614-10625.
93. Rocha SM, Cristovao AC, Campos FL et al. Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. **Neurobiology of disease**. 2012;47:407-415.
94. Bryson JB, Machado CB, Crossley M et al. Optical control of muscle function by transplantation of stem cell-derived motor neurons in mice. **Science**. 2014;344:94-97.
95. Roy NS, Cleren C, Singh SK et al. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. **Nature medicine**. 2006;12:1259-1268.
96. Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts. **Neuroscience**. 1996;75:979-985.
97. Glavaski-Joksimovic A, Virag T, Mangatu TA et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting genetically modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote recovery in a rat model of Parkinson's disease. **Journal of neuroscience research**. 2010;88:2669-2681.
98. Sinclair SR, Svendsen CN, Torres EM et al. GDNF enhances dopaminergic cell survival and fibre outgrowth in embryonic nigral grafts. **Neuroreport**. 1996;7:2547-2552.

99. Sautter J, Tseng JL, Braguglia D et al. Implants of polymer-encapsulated genetically modified cells releasing glial cell line-derived neurotrophic factor improve survival, growth, and function of fetal dopaminergic grafts. **Experimental neurology**. 1998;149:230-236.
100. Sullivan AM, Pohl J, Blunt SB. Growth/differentiation factor 5 and glial cell line-derived neurotrophic factor enhance survival and function of dopaminergic grafts in a rat model of Parkinson's disease. **The European journal of neuroscience**. 1998;10:3681-3688.
101. Deierborg T, Soulet D, Roybon L et al. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**. 2008;85:407-432.
102. Trupp M, Ryden M, Jornvall H et al. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. **The Journal of cell biology**. 1995;130:137-148.
103. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. **Nature**. 1996;382:80-83.
104. Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA et al. Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. **Experimental neurology**. 1999;158:504-528.
105. Homma S, Oppenheim RW, Yaginuma H et al. Expression pattern of GDNF, c-ret, and GFRalphas suggests novel roles for GDNF ligands during early organogenesis in the chick embryo. **Developmental biology**. 2000;217:121-137.
106. Rodriguez-Martinez G, Molina-Hernandez A, Velasco I. Activin A promotes neuronal differentiation of cerebrocortical neural progenitor cells. **PLoS one**. 2012;7:e43797.
107. Lopez-Gonzalez R, Camacho-Arroyo I, Velasco I. Progesterone and 17beta-estradiol increase differentiation of mouse embryonic stem cells to motor neurons. **IUBMB life**. 2011;63:930-939.
108. Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 1996;16:4069-4079.
109. Miles GB, Yohn DC, Wichterle H et al. Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2004;24:7848-7858.
110. Vilchis C, Vargas J, Ayala GX et al. Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. **Neuroscience**. 2000;95:745-752.
111. de Jesus Aceves J, Rueda-Orozco PE, Hernandez R et al. Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. **Frontiers in systems neuroscience**. 2011;5:6.
112. Arenas E. Foxa2: the rise and fall of dopamine neurons. **Cell stem cell**. 2008;2:110-112.
113. Andressoo JO, Saarma M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopamine neurons. **Current opinion in neurobiology**. 2008;18:297-306.
114. Kittappa R, Chang WW, Awatramani RB et al. The foxa2 gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. **PLoS biology**. 2007;5:e325.
115. Roeper J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. **Trends in neurosciences**. 2013;36:336-342.
116. Beitz JM. Parkinson's disease: a review. **Frontiers in bioscience**. 2014;6:65-74.
117. Thompson L, Barraud P, Andersson E et al. Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2005;25:6467-6477.

118. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European journal of pharmacology**. 1968;5:107-110.
119. Cass WA, Manning MW. GDNF protection against 6-OHDA-induced reductions in potassium-evoked overflow of striatal dopamine. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 1999;19:1416-1423.
120. Lee SK, Lee B, Ruiz EC et al. Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. **Genes & development**. 2005;19:282-294.
121. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**. 1997;106:348-360.
122. Kruman, II, Pedersen WA, Springer JE et al. ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. **Experimental neurology**. 1999;160:28-39.
123. Guo G, Bhat NR. p38alpha MAP kinase mediates hypoxia-induced motor neuron cell death: a potential target of minocycline's neuroprotective action. **Neurochemical research**. 2007;32:2160-2166.
124. Foran E, Trotti D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & redox signaling**. 2009;11:1587-1602.
125. Christophersen NS, Gronborg M, Petersen TN et al. Midbrain expression of Delta-like 1 homologue is regulated by GDNF and is associated with dopaminergic differentiation. **Experimental neurology**. 2007;204:791-801.
126. Engele J. Spatial and temporal growth factor influences on developing midbrain dopaminergic neurons. **Journal of neuroscience research**. 1998;53:405-414.
127. Akerud P, Canals JM, Snyder EY et al. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2001;21:8108-8118.
128. Lamas NJ, Johnson-Kerner B, Roybon L et al. Neurotrophic requirements of human motor neurons defined using amplified and purified stem cell-derived cultures. **PLoS one**. 2014;9:e110324.
129. Ernsberger U. The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons. **Cell and tissue research**. 2008;333:353-371.
130. Buss RR, Gould TW, Ma J et al. Neuromuscular development in the absence of programmed cell death: phenotypic alteration of motoneurons and muscle. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2006;26:13413-13427.
131. Yang F, Feng L, Zheng F et al. GDNF acutely modulates excitability and A-type K(+) channels in midbrain dopaminergic neurons. **Nature neuroscience**. 2001;4:1071-1078.
132. Cummins TR, Black JA, Dib-Hajj SD et al. Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2000;20:8754-8761.
133. Zeng F, Watson RP, Nash MS. Glial cell-derived neurotrophic factor enhances synaptic communication and 5-hydroxytryptamine 3a receptor expression in enteric neurons. **Gastroenterology**. 2010;138:1491-1501.

ANEXO I, ARTÍCULO ORIGINAL PUBLICADO: Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation, Differentiation, Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells.



Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation, Differentiation, Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells

Daniel Cortés^{1,2}, Yolanda Robledo-Arratia¹, Ricardo Hernández-Martínez¹, Itzel Escobedo-Ávila¹, José Bargas¹ and Iván Velasco^{1,2*}

¹ Instituto de Fisiología Celular—Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,

² Laboratorio de Reprogramación Celular del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México en el Instituto Nacional de Neurología y Neurología “Manuel Velasco Suárez”, Mexico City, Mexico

Embryonic stem cells (ESC) are pluripotent and thus can differentiate into every cell type present in the body. Directed differentiation into motor neurons (MNs) has been described for pluripotent cells. Although neurotrophic factors promote neuronal survival, their role in neuronal commitment is elusive. Here, we developed double-transgenic lines of mouse ESC (mESC) that constitutively produce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and also contain a GFP reporter, driven by HB9, which is expressed only by postmitotic MNs. After lentiviral transduction, ESC lines integrated and expressed the human GDNF (hGDNF) gene without altering pluripotency markers before differentiation. Further, GDNF-ESC showed significantly higher spontaneous release of this neurotrophin to the medium, when compared to controls. To study MN induction, control and GDNF cell lines were grown as embryoid bodies and stimulated with retinoic acid and Sonic Hedgehog. In GDNF-overexpressing cells, a significant increase of proliferative Olig2+ precursors, which are specified as spinal MNs, was found. Accordingly, GDNF increases the yield of cells with the pan motor neuronal markers HB9, monitored by GFP expression, and Isl1. At terminal differentiation, almost all differentiated neurons express phenotypic markers of MNs in GDNF cultures, with lower proportions in control cells. To test if the effects of GDNF were present at early differentiation stages, exogenous recombinant hGDNF was added to control ESC, also resulting in enhanced MN differentiation. This effect was abolished by the co-addition of neutralizing anti-GDNF antibodies, strongly suggesting that differentiating ESC are responsive to GDNF. Using the HB9::GFP reporter, MNs were selected for electrophysiological recordings. MNs differentiated from GDNF-ESC, compared to control MNs, showed greater electrophysiological maturation, characterized by increased numbers of evoked action potentials (APs), as well as by the appearance of rebound APs, sag inward rectification, spike frequency adaptation and spontaneous synaptic potentials. Upon challenge with kainate, GDNF-overexpressing cells are more resistant to

OPEN ACCESS

Edited by:

Shawn Hayley,
Carleton University, Canada

Reviewed by:

Gourav Roy Choudhury,
Texas Biomedical Research Institute,
USA

Tatsuro Mutoh,
Fujita Health University, Japan

*Correspondence:

Iván Velasco
ivelasco@ifc.unam.mx

Received: 31 May 2016

Accepted: 30 August 2016

Published: 12 September 2016

Citation:

Cortés D, Robledo-Arratia Y, Hernández-Martínez R, Escobedo-Ávila I, Bargas J and Velasco I (2016) Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation, Differentiation, Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 10:217. doi: 10.3389/fncel.2016.00217

excitotoxicity than control MNs. Together these data indicate that GDNF promotes proliferation of MN-committed precursors, promotes neuronal differentiation, enhances maturation, and confers neuroprotection. GDNF-expressing ESC can be useful in studies of development and disease.

Keywords: glial cell line-derived neurotrophic factor, committed neural precursors, spinal motor neuron, electrophysiological maturation, excitotoxicity, neuroprotection

INTRODUCTION

Embryonic stem cells (ESC) are capable of self-renewal and differentiation towards any mature cell from the three germ layers. Neural induction of mouse ESC (mESC) has been used as a cellular model to understand basic mechanisms of differentiation and physiology of postmitotic neurons. Importantly, ESC have been differentiated using neural medium and stimulation with morphogens such as sonic hedgehog and retinoic acid for ventralization and caudalization of neural precursors, respectively; this protocol yields spinal motor neurons (MNs; Wichterle et al., 2002). Once differentiated, neurons should grow axons and survive in their environment. This survival has been linked to the stimulation of specific receptors by neurotrophic factors, such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF; Lin et al., 1993; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996). GDNF knock-out (KO) mice present alterations such as renal and ureteral agenesis and absence of enteric nervous system. Other cell types including sensory, sympathetic and parasympathetic neurons, as well as cranial (trigeminal) and spinal (L1–L6) motor nuclei are partially affected. This neurotrophin activates heteromeric receptor complexes formed by c-RET and GFR α 1; reported mutations on both c-RET and GDNF are associated to neuropathological conditions such as aganglionic megacolon (Hirschsprung's disease; Angrist et al., 1996; Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996). The effects of GDNF were first observed when it was applied to mesencephalic dopaminergic neurons, causing increased axonal branching and survival (Lin et al., 1993). Stimulation of GDNF receptors is also related to higher survival of MNs both *in vitro* and *in vivo* (Moore et al., 1996; Rakowicz et al., 2002). *In ovo* administration of GDNF rescues MN from programmed cell death during chick development (Oppenheim et al., 1995). Similarly, this neurotrophin is protective in a postnatal mouse axonal injury model (Oppenheim et al., 1995), and also rescues MNs in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis (Krakora et al., 2013; Islamov et al., 2015).

GDNF also induces axonal sprouting (Mount et al., 1995; Rosenblad et al., 2000) and enhances the spontaneous neurotransmitter release in nerve-muscle co-cultures (Yang and Nelson, 2004). The properties that GDNF promotes in final differentiation and specifically in synaptic transmission and electrophysiological activity have been studied in *Xenopus laevis* where GDNF enhances spontaneous transmission and also an increase in quantal size (Wang et al., 2001, 2002). This initial electrophysiological characterization on the effects of GDNF was carried out in non-mammalian cells. When MN development has been studied in mammalian newborn MN,

specific features of these neurons have been uncovered. Calcium and/or sodium channels appear early, while calcium-dependent potassium channels are expressed later, contributing to a rapid hyperpolarization and modulating firing rate (Spitzer et al., 2000). On the other hand, some of the electrophysiological properties in mESC-derived MNs have been characterized. These neurons present tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium currents, potassium conductance and nickel-sensitive calcium channels. In addition, they show action potentials (APs) or rebound APs (RAPs), after hyperpolarization, as well as spike frequency adaptation (SFA) but only after extended periods of time or after co-culture with muscle cells (Miles et al., 2004; Takazawa et al., 2012). Alternatively, the electrophysiological maturation of ESC-derived MNs can be achieved by co-culturing them with astrocytes (Bryson et al., 2014; Kiskinis et al., 2014) or primary neurons (Li et al., 2015) for long periods. Thus, maturation of MNs differentiated *in vitro* requires exogenous factors such as neurotrophins and/or the co-culture with other cell types; in these papers, no direct assessment of GDNF actions on these electrophysiological properties were studied in ESC-derived MN.

Furthermore, a large amount of knowledge has been accumulated regarding the effects of GDNF in neuronal survival and some in maturation. However, very little is known about its role when neural precursors are still proliferating. For instance, research looking into the localization of GDNF and its receptors during development found that spinal cord, brainstem and dorsal root ganglia expressed GFR α 1 from E10, when the neural tube has barely formed and neural precursors are not specified yet (Trupp et al., 1995; Treanor et al., 1996; Golden et al., 1999; Homma et al., 2000). At these early stages neuronal differentiation is starting while GDNF is expressed in the incipient limb bud, too early to induce any sprouting or trophic effects on postmitotic neurons. The fact that skeletal muscle appears after E12 to protract MN axons, suggests that GDNF might influence neural precursors.

The objective of the present set of experiments was to perform neuronal differentiation of ESC to MNs and to gain further knowledge on the role of this neurotrophin during neuronal differentiation, maturation and survival. Previously, we reported that mESC differentiate to MNs after stimulation of embryoid bodies (EBs) with retinoic acid and Sonic Hedgehog, producing MN positive for Beta-Tubulin III, GFP (reflecting Hb9 expression) and Islet1 (López-González et al., 2009). We now report the generation of mESC lines that constitutively secrete GDNF, from the pluripotent state to the terminal differentiated MNs. These engineered cells produced higher numbers of

cycling neural precursors specified for MN, resulting in a higher proportion of terminally differentiated neurons. Using a MN-fluorescent reporter we performed electrical recordings. GDNF-expressing neurons exhibited more signs of maturity than control cells after 9 days of differentiation, without co-culturing them with muscle, astrocytic or neuronal cells. Furthermore, GDNF protected MNs from toxic insults such as kainate.

MATERIALS AND METHODS

Lentiviral Construction

All recombinant DNA work was performed according to the National Institutes of Health Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules. Human GDNF (hGDNF) complementary DNA (cDNA) was a kind gift from Dr. Martha C. Bohn. The plasmid containing the GDNF cDNA (pAAV-MCS-hGDNF) was digested and the fragment containing the cDNA was separated by agarose electrophoresis and column-purified. The 639 bp fragment was ligated into the lentiviral vector pLVX-EF1 α -IRES-Puro (Clontech 631988) to produce the pLVX-EF1 α -hGDNF-IRES-Puro plasmid. The resulting plasmid was sequenced and verified to contain hGDNF.

Production of CTRL-ESC and GDNF-ESC

Lentiviral particles were produced accordingly to the manufacturer's instructions (Clontech protocol PT5135-1). Empty vector (control, CTRL) or hGDNF containing plasmids, together with lenti-X HTC packaging mix and Xfect reaction buffer were mixed with Xfect polymer and then poured into a previously seeded HEK294FT cells. Forty-eight hours later, supernatants were collected and added to the R1 mESC. Puromycin treatment (2 μ g/ml) was initiated 24 h later, and 4 days after treatment, several resistant colonies were obtained.

Genotyping

Selected colonies were lysed and genomic DNA was extracted; end-point PCR for hGDNF detection was performed using a 30-cycle program at 59°C. Primers (all in 5' \rightarrow 3') for GAPDH were: Forward, ATCACCATCTTCCAGGAGCG and Reverse, CCTGCTTACCACCTTCTTG and for transgenic hGDNF: Forward, AACAAATGGCAGTGCTTCCT and Reverse, AGCCGCTGCAGTACCTAAAA. The same protocol and primers were used for mRNA using Trizol extraction protocol after DNase treatment (López-González et al., 2011; Rodríguez-Martínez et al., 2012).

Western Blot

Briefly, cells were homogenized in lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7, 1% IGEPAL, 100 mM NaCl) and supplemented with protease inhibitors (Roche). Proteins were obtained by centrifugation at 13,800 g at 4°C for 15 min, and quantified by Bradford assay (Bio-Rad). Proteins (30 μ g) were resolved on 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience). The membranes were blocked

with 5% non-fat milk and incubated overnight with primary antibodies. Pre-stained markers (Invitrogen) were included for size determination. The following antibodies were used: rabbit anti-GDNF (1:1000, sc-9010 Santa Cruz Biotechnology) and anti-GAPDH (1:1000, MAB374 Millipore). Membranes were washed and incubated with corresponding horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (1:10,000, Santa Cruz) for 2 h. Immunoreactive bands were detected using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Bioscience) and developed on photographic film (Kodak).

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for GDNF

To quantify secreted GDNF, 24 h-conditioned media were obtained from CTRL-ESC and GDNF-ESC. The media were collected from undifferentiated mESC and from day-6 EBs, which already contained differentiated MNs. The kit GDNF Emax Immunoassay system was purchased from Promega and used as indicated by the manufacturer's booklet.

Production of Reporter Lines to Monitor MN Differentiation

CTRL-ESC or GDNF-ESC were electroporated with HB9::GFP plasmid (a kind donation from Dr. Hynek Wichterle) and selected with neomycin (500 μ g/ml) or hygromycin B (150 μ g/ml), respectively, to create CTRL-ESC/HB9::GFP or GDNF-ESC/HB9::GFP.

Motoneuron Differentiation

MNs were differentiated as reported (Wichterle et al., 2002) with some minor modifications. Briefly, ESC are maintained undifferentiated in KO DMEM supplemented with 15% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 2 mM glutamax, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 50 UI/ml penicillin-streptomycin (all from Invitrogen) and 1000 U Leukemia Inhibitory Factor (ESGRO, Millipore). Cells were dissociated to form EBs in non-adherent plates in DFNK (DMEM:F12, Neurobasal, 10% serum replacement, 0.5 mM glutamax, 35 μ M 2-mercaptoethanol and 50 UI/mL penicillin-streptomycin; Invitrogen) with medium change every other day. From day 2 to day 6 EBs are cultured in the presence of 2 μ M retinoic acid and 10 μ M purmorphamine (Millipore). At day 6 EBs are dissociated with TrypLE express (Invitrogen), seeded on poly-L-ornithine and fibronectin-coated coverslips in N2B27 (DMEM:F12, Neurobasal medium, N-2 supplement, and B-27 supplement plus penicillin-streptomycin; Invitrogen) for three additional days.

Immunofluorescence

Cell cultures were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in phosphate buffer saline (PBS) plus 10% normal goat serum. Cells were washed three times and secondary antibodies incubated for 2 h in the same solution, washed three times

and incubated with Hoechst for nuclei staining. Primary antibodies were used with the following dilutions: Oct 3/4, 1:200 (BD 611202); Sox2, 1:1000 (Millipore AB5603); GFP, 1:1000 (Invitrogen A11122); Olig2, 1:1000 (Millipore MANB50); Islet1, 1:10 (developmental studies hybridoma bank 40.3A4-5 and 40.2D6); TUJ1 (recognizing Tubulin β III), 1:1000 (Covance MRB-435P); Microtubule Associated Protein (MAP2), 1:1000 (Chemicon MAB378); Phospho Histone H3, 1:100 (Cell Signaling 9701S). Alexa Fluor secondary antibodies were used at 1:1000. EBs cultured for 5 days were harvested by gravity, washed with PBS and paraformaldehyde-fixed, cryo-protected by sucrose, tissue tek-embedded, cut in 20 μ m slices and mounted in slides for immunofluorescence protocol.

Retro-Transcription Followed by Quantitative PCR

Total RNA was isolated from CTRL- and GDNF-ESC. Reverse transcription was performed with random hexamers to produce cDNA, as previously reported (Rodríguez-Martínez et al., 2012). The following primers were used to perform qPCR, starting with 100 ng of cDNA: *Oct4*: Forward (Fwd), TTG GGC TAG AGA AGG ATG TGG TT; Reverse (Rev), GGA AAA GGG ACT GAG TAG AGT GTG G. For *Sox2*: Fwd, GCA CAT GAA CGG CTG GAG CAA CG; Rev, TGC TGC GAG TAG GAC ATG CTG TAG G. For *Nanog*: Fwd, TAT CTG GTG AAC GCA TCT GG and Rev, GAA GTT ATG GAG CGG AGC AG. The house keeping gene *Actin* was used to normalize the expression of the former genes in CTRL-ESC HB9::GFP and compare them with GDNF-ESC HB9::GFP. Results are expressed as fold-change relative to CTRL-ESC.

Electrophysiology

The expression of GFP under the HB9 promoter enables the visual identification of differentiated MNs. Because the main interest of several previous studies was the expression of the MN phenotype, such neurons were co-cultured with muscle fibers (Miles et al., 2004; Takazawa et al., 2012). However, this co-culture system might have uncontrolled factors in addition to GDNF. To test the actions of this single growth factor, we decided to study differentiated MNs without mixing them with muscle. Therefore, whole cell patch recordings on HB9::GFP-expressing neurons plated on fibronectin were performed after identification by fluorescence. Control and GDNF-expressing samples were recorded after 9 days *in vitro* in order to obtain signs of excitability in different cells. Together with different signs of excitability, membrane properties such as resting membrane potential (RMP) and whole cell input resistance (R_N) were measured from the I-V plots built from the recordings: after identification, neurons were visualized using infrared differential interference microscopy (DIC, Nikon). Micropipettes for whole cell recordings were pulled (Sutter Instruments) from borosilicate glass tubes (1.5 mm OD, WPI) for a final DC resistance of 4–6 M Ω when filled with an internal solution with the following composition (in mM): 120 KMeSO₃, 10 NaCl, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg²⁺-ATP,

0.4 Na⁺-GTP and 1% biocytin (pH = 7.2, 282 mosmol/l) for a pCa²⁺ of about 6.5 (Vilchis et al., 2000). Extracellular saline had (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄ and 15 glucose (pH = 7.4, 300 mosmol/l, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂). Recordings were made at room temperature (~25°C) and obtained with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) while monitored with an oscilloscope (Tektronix; de Jesús Aceves et al., 2011). Signals were filtered at 1–3 kHz and digitized at 3–9 kHz with an AT-MIO-16E4 board (National Instruments) in a PC computer. Data acquisition used custom software designed in the LabVIEW environment (National Instruments). R_N was measured from the slope of current-voltage (I-V plots) relationships at -60 mV. The latter were obtained with either depolarizing or hyperpolarizing rectangular voltage steps (current-clamp) or voltage commands (voltage-clamp). RMP was measured in current-clamp at zero current. Percentages of neurons exhibiting diverse signs of excitability suggesting various differentiating stages were obtained in both samples and compared (see “Results” Section).

Toxicity Assay

Terminally differentiated MNs were exposed 20 min to vehicle or 300 μ M kainate and evaluated 24 h later (Carriedo et al., 1996) by immunostaining.

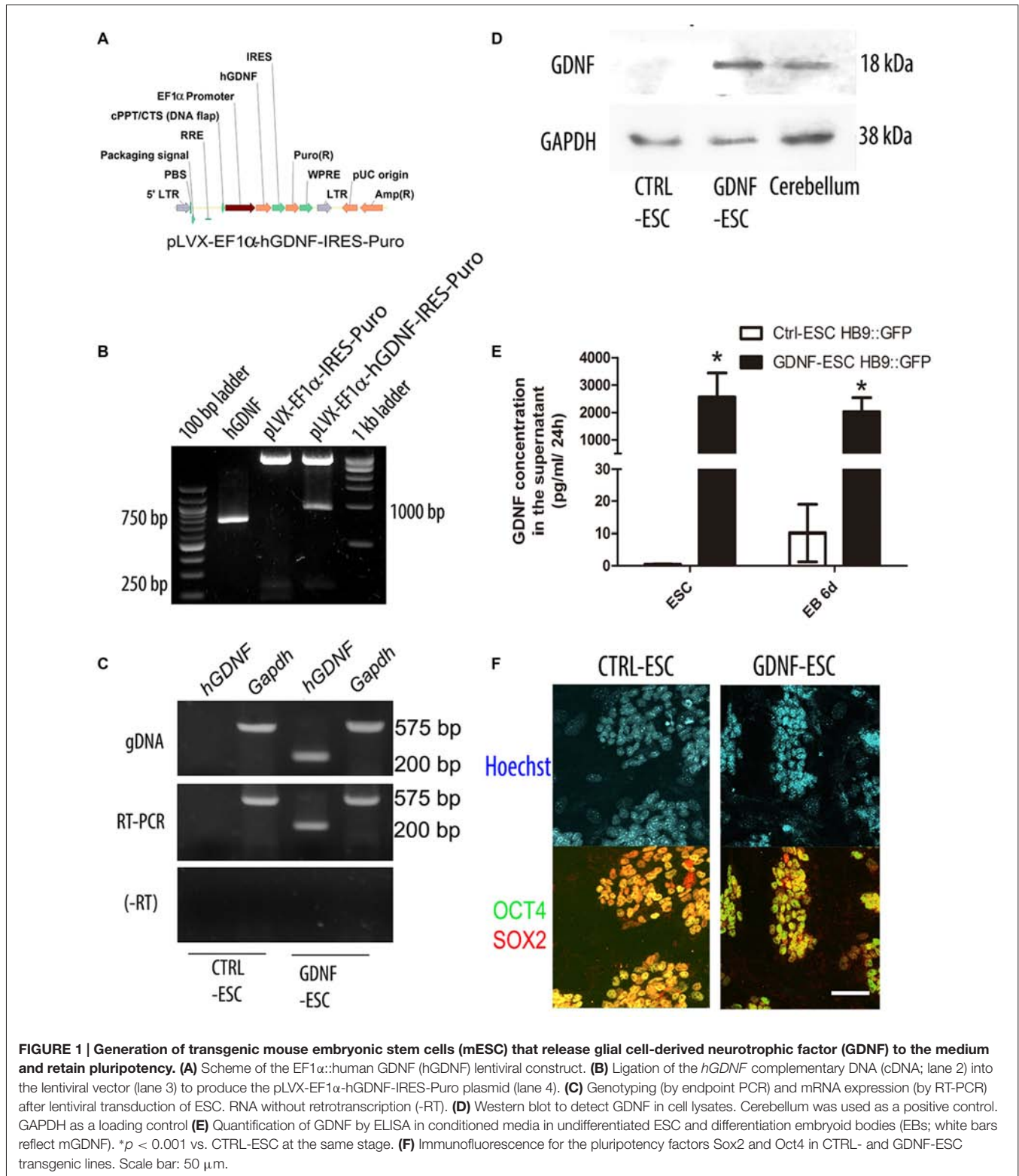
Statistical Analysis

All experiments were performed in duplicate. Results were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni analysis or *t*-tests. For electrophysiology, the Mann-Whitney U test was used to compare unpaired samples. Multiple treatments were compared with the Kruskal-Wallis ANOVA and *post hoc* Dunn statistics. RAP, inward rectification (sag) and calcium potential differences were analyzed by Chi-square test. $P < 0.05$ was used as significance level.

RESULTS

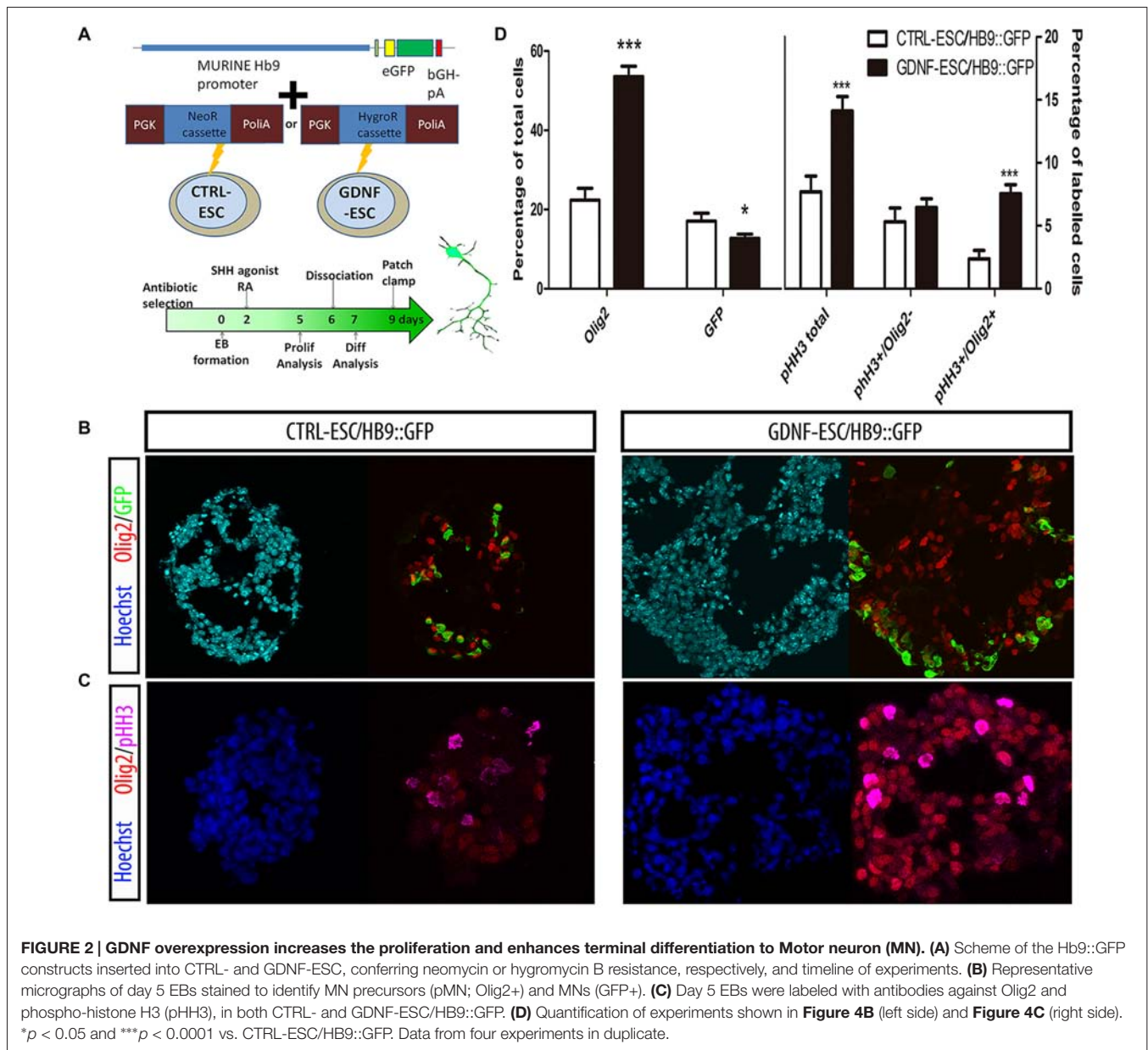
Generation of GDNF-Expressing ESC

In order to produce stable ESC lines that produce hGDNF, we prepared lentiviral vectors that confers puromycin resistance (CTRL) or simultaneously allows expression of hGDNF and puromycin resistance (Figures 1A,B). Lentiviral particles were harvested and added to mESC, followed by selection with puromycin for 4 days to obtain several colonies that were picked and expanded. Genotyping was carried on using specific primers for the hGDNF cDNA that does not detect the mouse *gdnf* gene. End-point PCR confirmed that several colonies integrated the hGDNF coding sequence, and we designated these as GDNF-ESC; empty vector-transduced cells were named CTRL-ESC (Figure 1C upper panel). RT-PCR demonstrated that hGDNF mRNA is expressed in GDNF-ESC but not in CTRL-ESC (Figure 1C middle and lower panel). Western blot analysis showed that GDNF protein can be detected in cell lysates of undifferentiated GDNF-ESC, and it is absent in CTRL-ESC (Figure 1D). However, the presence of GDNF in cell lysates



does not necessarily mean that the protein is being secreted in a sustained manner, especially if the cells were subject to differentiation protocols. For this reason, a well established

embryoid body-based differentiation protocol was performed and samples were measured at the beginning and the end of the differentiation procedure. Conditioned media were collected



and GDNF was quantified by ELISA. GDNF concentration was significantly higher in GDNF-ESC as compared to CTRL-ESC in both stages of differentiation (Figure 1E). To analyze if this increased production of GDNF altered pluripotency-associated markers, undifferentiated ESC were labeled with antibodies directed against the transcription factors Sox2 and Oct4, with similar levels found in CTRL- and GDNF-ESC, suggesting that pluripotency was not compromised by GDNF (Figure 1F). In agreement, no significant differences between CTRL-ESC and GDNF-ESC were found when the expression of the pluripotency markers *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* were quantified by RT-qPCR, normalized by *Actin*: *Oct4* showed 3.14 ± 0.998 fold-increase, *Sox2* was 0.893 ± 0.137 and *Nanog* 0.592 ± 0.434 in GDNF-ESC, when compared to CTRL-ESC.

GDNF-ESC Produces More MN Precursors and Higher Numbers of Postmitotic MNs

GDNF is known for having several neuronal targets, which includes MNs. We decided to study MN differentiation by using a reporter construct that expresses GFP under control of the HB9 promoter, which directs its expression only in postmitotic MNs. This reporter appears early during EB formation and allows the identification of MNs. The HB9::GFP plasmid was co-transfected with either neomycin or hygromycin B resistance cassettes in CTRL- or GDNF-ESC, respectively, and selected with the appropriate antibiotic to produce CTRL-ESC/HB9::GFP or GDNF-ESC/HB9::GFP (Figure 2A). Several clones were picked and genotyped for GFP integration (data not shown). Experiments were done in six clones (three for CTRL-ESC and

three for GDNF-ESC) with similar results within both groups (data not shown). We observed that during EB formation, even prior to GFP detection, GDNF-ESC EBs were larger than control, suggesting that GDNF is changing the proliferation rate during EB formation. Olig2 is a transcription factor that regulates the replication of precursors that eventually will become first MN or later on oligodendrocytes (Lee et al., 2005). At day 5 of the differentiation protocol, EBs were fixed, sliced and immunofluorescences for Olig2 and GFP were performed. GDNF-ESC/HB9::GFP EBs had significantly higher proportions of Olig2 expressing cells compared to CTRL-ESC/HB9::GFP. In parallel, a discrete but significantly lower proportion of GFP+ newborn neurons was found in GDNF-ESC/HB9::GFP vs. CTRL-ESC/HB9::GFP (Figures 2B,D). Next, we asked whether the Olig2 expansion was caused by higher proliferation rates. The phosphorylation at serine 10 of histone H3 (pHH3) is associated with mitotic activity (Hendzel et al., 1997); we observed an increased number of pHH3+ cells in GDNF-ESC/HB9::GFP cultures (Figure 2C). Olig2 and pHH3 double-positive cells were significantly increased by GDNF. The proliferative effect of GDNF seems to specifically target Olig2 positive cells, since no differences were found in pHH3+/Olig2-cells (Figures 2C,D).

Postmitotic neurons were evaluated after dissociation of EBs and replating. Islet1 (Isl1) is a transcription factor that is normally expressed early during MN differentiation, and together with HB9 comprise pan-MN markers (Amoroso et al., 2013). We analyzed these markers by staining for Isl1 and the HB9 reporter GFP, as well as with the TUJ1 antibody that recognize neuronal class III beta-Tubulin in differentiated cultures. We found that the GFP+/Isl1- cells did not change in GDNF-expressing cells. However, significant increases were observed for GFP-/Isl1+ and GFP+/Isl1+ cells, accounting for a 2.3-fold increase in the total MN proportion for GDNF-ESC/HB9::GFP. A less marked, albeit a significant increase (1.6-fold), was observed in young neurons labeled by TUJ1 in GDNF-cells (Figures 3A,B). Noteworthy, almost every neuron presented a MN phenotype in GDNF-ESC/HB9::GFP; since only 3% did not express GFP or Isl1, but this proportion was 30% in control cells (Figure 3C).

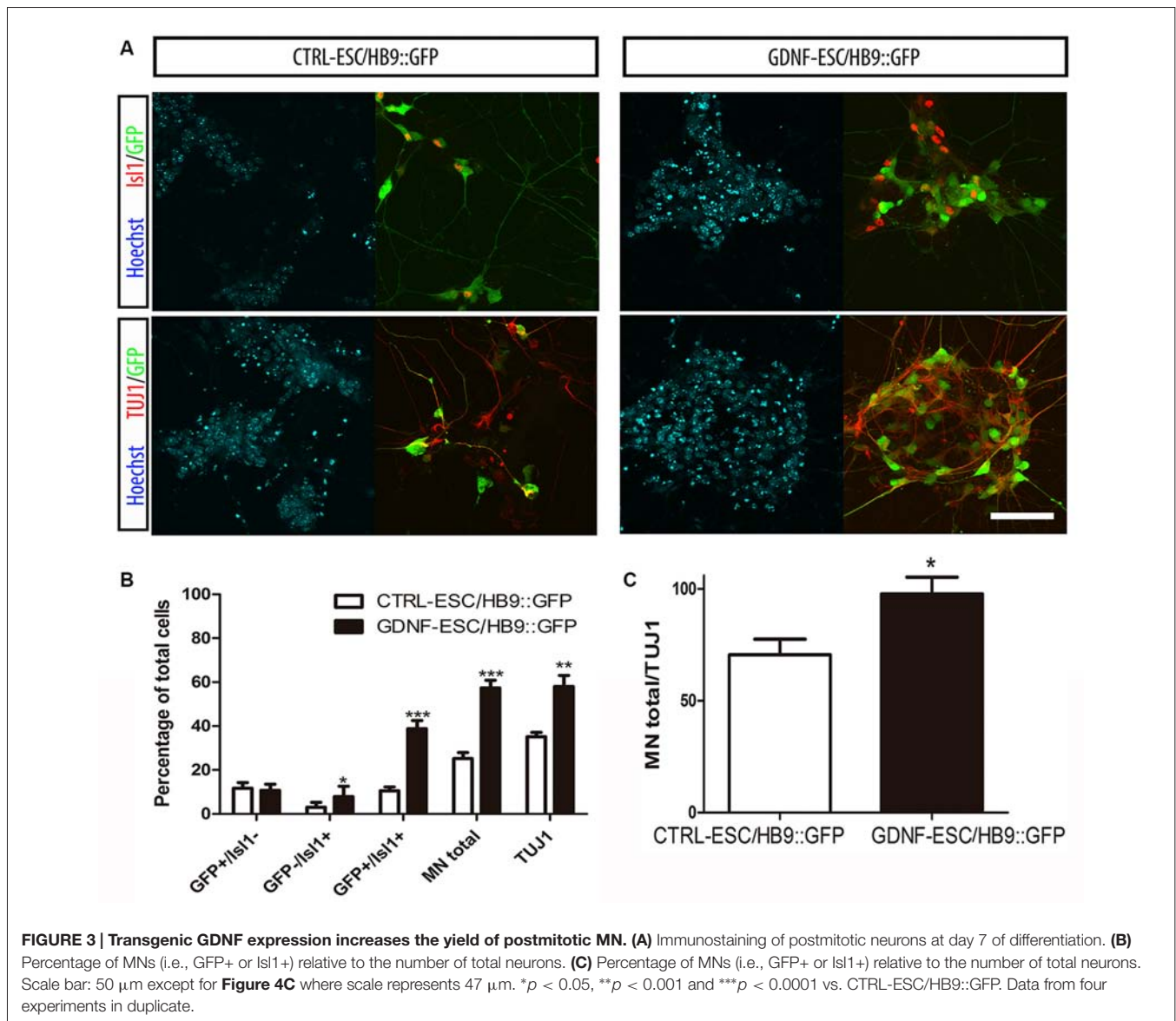
Early Addition of Exogenous GDNF Increases MN Differentiation

To investigate if GDNF has to be present throughout differentiation as in the overexpressing lines, or its influence is more effective during certain stages, we transiently added recombinant hGDNF (rhGDNF) at specific periods of differentiating CTRL-ESC/HB9::GFP. These control cells were differentiated without rhGDNF (Figure 4A), or with rhGDNF added: (i) prior to formation of EBs (Figure 4B); (ii) during EBs (Figure 4C); and (iii) after dissociation and replating (Figure 4D). Although the addition of rhGDNF in these periods increased total MN differentiation relative to the condition without rhGDNF, this rise was significant only when the neurotrophin was supplemented before EB

formation (Figures 4E,F). However, GDNF added solely in any of these stages, does not reach the same level of MN induction compared to the transgenic secretion (Figure 3B). The unexpected early effect of GDNF, together with the enhanced proliferation of MN precursors, suggests that GDNF effects start early-on, but the neurotrophin needs to be present throughout the differentiation time course to further increase MN differentiation as in GDNF-ESC HB9::GFP. To further validate the specificity of GDNF, we decided to incubate differentiating CTRL-ESC HB9::GFP with exogenous rhGDNF with or without neutralizing anti-GDNF (4 µg/ml) antibodies. This initial exposure was made from the pluripotent condition up to day-2 EBs. We observed that addition of anti-GDNF inhibits the increase in MN expansion promoted by exogenous rhGDNF (Figure 4F), supporting an early role of GDNF during MN differentiation.

Overexpression of GDNF Increases Excitability and Maturation of ESC-Derived MNs

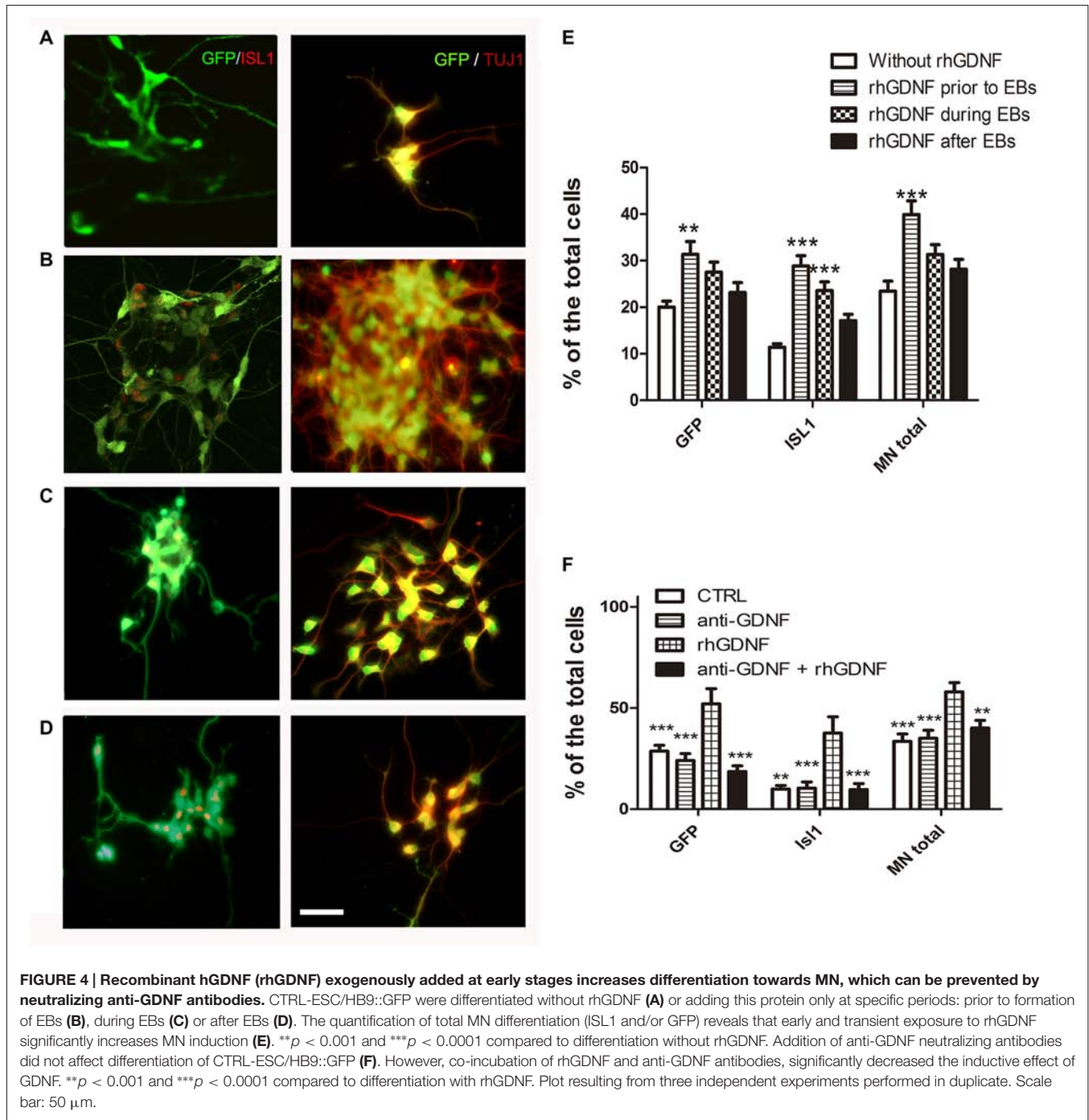
For MNs, a reporter construct (Wichterle et al., 2002) has been designed for the prospective identification of live neurons allowing electrophysiological studies. CTRL- and GDNF-ESC were transfected with the HB9::GFP plasmid and the electrophysiological properties of four cell lines (two CTRL-ESC/HB9::GFP and two GDNF-ESC/HB9::GFP) were recorded after MN differentiation in cells identified by GFP expression. Whole-cell voltage-clamp and current-clamp recordings were made to perform current-voltage (I-V) relationships (not shown) to obtain passive membrane properties. Since our interest is focused in excitability at various stages of maturity, only voltage or currents in response to current injections or voltage commands, respectively, are depicted. Figure 5 shows that at 9 days in culture, CTRL-ESC/HB9::GFP (left column) and GDNF-ESC/HB9::GFP (right column) cells showed various stages of MN differentiation: from subthreshold non-propagating local responses (Aidley, 1998; Figure 5B, arrowhead), not equally observed in both groups (Figure 5A), mixed sodium and calcium regenerative events, known to be characteristic of MN development (Spitzer et al., 2000; Figures 5C,D, arrows) to repetitive firing of sodium-generated APs. These responses were obtained with depolarizing and hyperpolarizing current steps. GDNF-expressing MNs showed apparently larger inward rectification denoted by depolarizing sags upon hyperpolarization (sag arrow in Figure 5F) and RAPs when the hyperpolarization ended (RAP arrow; Figure 5F); the other arrow in Figure 5F denotes a putative spontaneous synaptic event. The proportion of neurons that showed firing was significantly higher in GDNF-expressing cells, showing a 2.3-fold increase compared to control MNs (Figure 5G). However, RMP was not different (Figure 5H), although 75% of the GDNF-expressing neuronal population was below the median of the control sample. Similarly, in whole neuron R_N no differences were noted, although the distribution of GDNF-expressing cells was compacted and with less variability (Figure 5I). Regarding more mature signs of MNs



excitability (Spitzer et al., 2000; Takazawa et al., 2012), the percentage of neurons exhibiting sags (inward rectification) and RAPs were significantly larger in GDNF-expressing neurons (Figures 5J,K). Although the presence of mixed sodium and calcium regenerative events was equally seen in both samples (Figure 5L), Ca^{2+} events in GDNF-expressing neurons had longer duration and more depolarized potentials (see Figures 5C,D).

Intensity-frequency plots showed that injection of current elicited APs in both CTRL- and GDNF-ESC HB9::GFP-derived MNs. However, such frequencies were higher in GDNF-ESC/HB9::GFP MNs. Not only frequencies augmented in the GDNF-producing neurons, but higher current intensities could be administered with no signs of spike inactivation, as observed with current applications of 40 pA or more in CTRL-ESC/HB9::GFP neurons (Figure 6).

Figure 7 illustrates some signs of excitability solely present in the GDNF-ESC/HB9::GFP cells, such as a spontaneous putative depolarizing and hyperpolarizing synaptic potentials (Figure 7A), that were abolished by the glutamate receptor antagonist CNQX (data not shown), spontaneous firing of APs (Figure 7B), inward and outward voltage-gated currents during voltage-clamp recordings (Figure 7C). When cells presented repetitive firing, it was common to observe SFA: first interspike interval was shorter than the last in the train (double-headed arrows in Figure 7D). Moreover, when repetitive firing could be evoked, it was completely blocked by 1 μ M of TTX (Figures 7E,F, same cell), suggesting that APs were generated by sodium currents. APs exhibited SFA, sag inward rectification and RAPs (Figure 7G). Cells in intermediate stages showed mixed sodium and calcium regenerative events (Spitzer et al., 2000; see also Figures 5C,D): TTX blocked the fast sodium component



(Figure 7H left to middle), while 40 μM Ni^{2+} (or Co^{2+} , not shown) blocked the slower plateau-like calcium component (Figure 7H middle to right). After TTX and Ni^{2+} , stronger current injections could not evoke any signs of excitability.

GDNF-ESC-Derived MNs are More Resistant to Kainic Acid

MNs are susceptible to a wide variety of insults including oxidative stress (Kruman et al., 1999), energy depletion (Guo

and Bhat, 2007) and excitotoxicity (Foran and Trotti, 2009). Glutamate or its agonists AMPA or kainate have been used to induce MN degeneration. MNs were incubated with kainate and the number of cells expressing GFP or ISL1 counted. Control MNs have an average reduction of 71% whereas GDNF-expressing cells have a 27% decrease. The survival of GFP+, ISL1+ and total MNs was significantly higher in GDNF-ESC/HB9::GFP compared to CTRL-ESC/HB9::GFP (Figure 8).

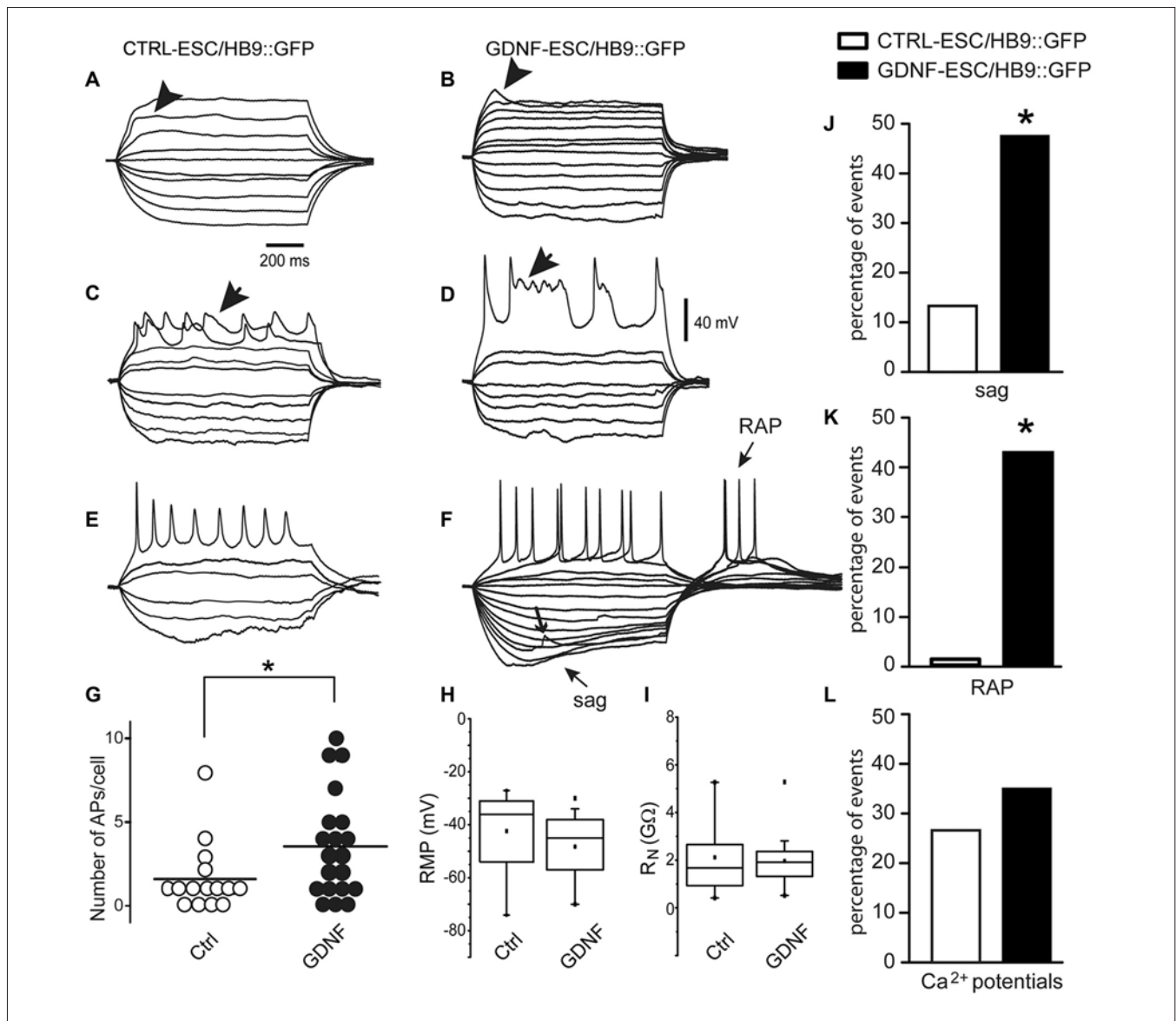


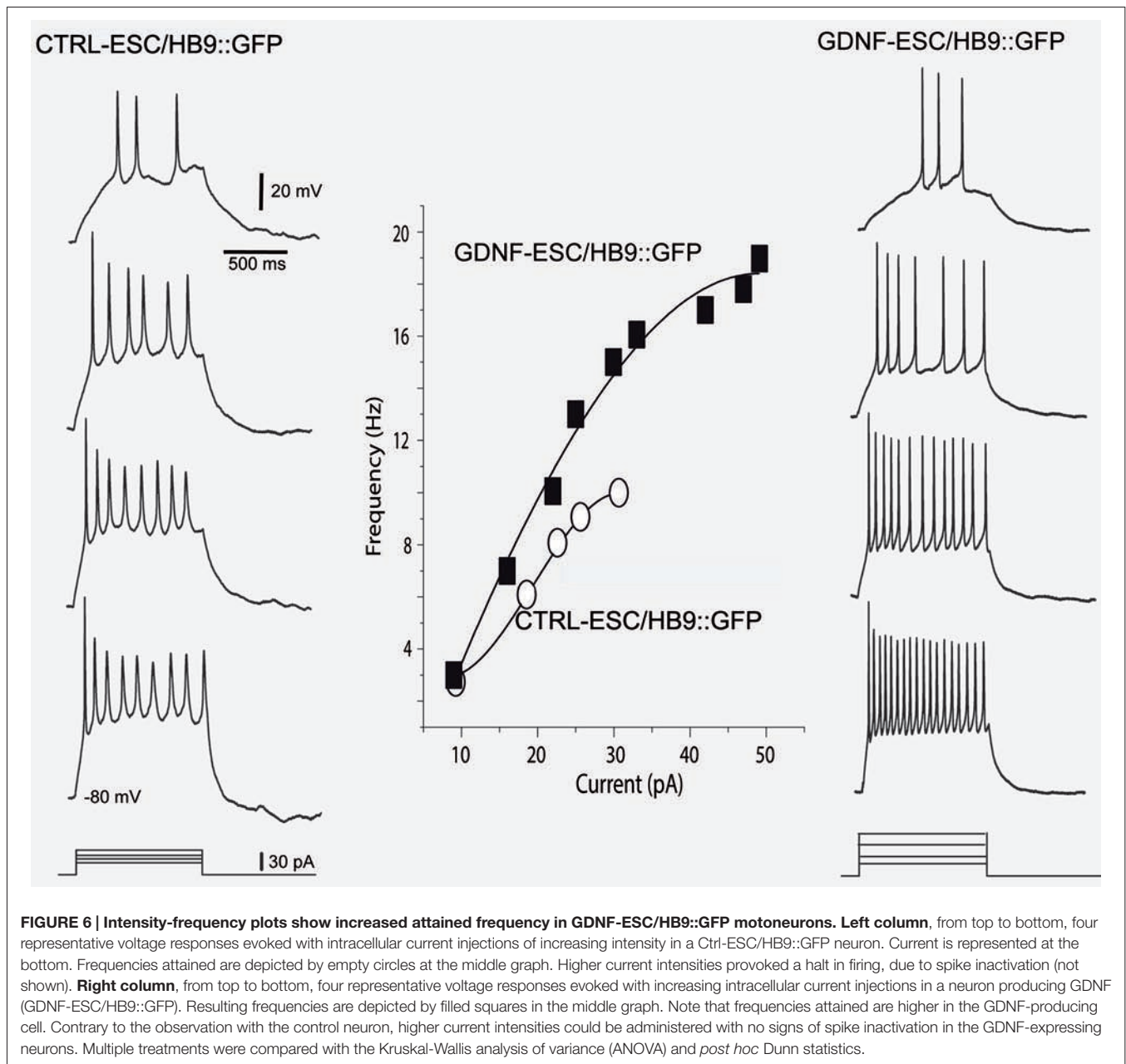
FIGURE 5 | Signs of excitability are more evident in MNs derived from GDNF-expressing cells. At 9 days in culture, CTRL-ESC/HB9::GFP (left column) and GDNF-ESC/HB9::GFP (middle column) MNs showed various stages of differentiation. **(A–F)** show voltage responses to depolarizing and hyperpolarizing current steps (not shown) injected intracellularly. **(A,B)** Arrowheads denote local responses appearing upon mostly passive electrical properties in both classes of neurons. **(C,D)** Arrows point towards regenerative responses with mixed sodium and calcium components. **(E,F)** Repetitive firing of action potentials (APs) in both classes of neurons. GDNF MNs showed larger inward rectification denoted by depolarizing sags upon hyperpolarization and rebound APs (RAPs) upon returning from it. Arrow denotes a putative spontaneous synaptic event **(F)**. **(G)** The average number of APs, significantly larger in GDNF-expressing cells. **(H,I)** Neither resting membrane potential (RMP) nor whole neuron input resistance (R_N) were significantly different. **(J)** Sag inward rectification was significantly larger in GDNF-expressing neurons. **(K)** RAPs after ending a hyperpolarization step were significantly higher in GDNF expressing neurons. **(L)** Ca^{2+} events was not significantly different between both samples (see **C,D**). * $p < 0.05$.

DISCUSSION

In this article, mESC lines with sustained GDNF-secreting properties were developed. This approach allowed us to: (1) discover that GDNF in EBs induced higher proliferation resulting in more committed MN precursors (pMN); (2) report that GDNF induced electrical maturation in MNs in the absence of exogenous factors; and (3) observe self-protection against

injury in MN cultures. Further, the addition of exogenous rhGDNF demonstrates that this trophic factor enhances MN differentiation when added at the pluripotent state.

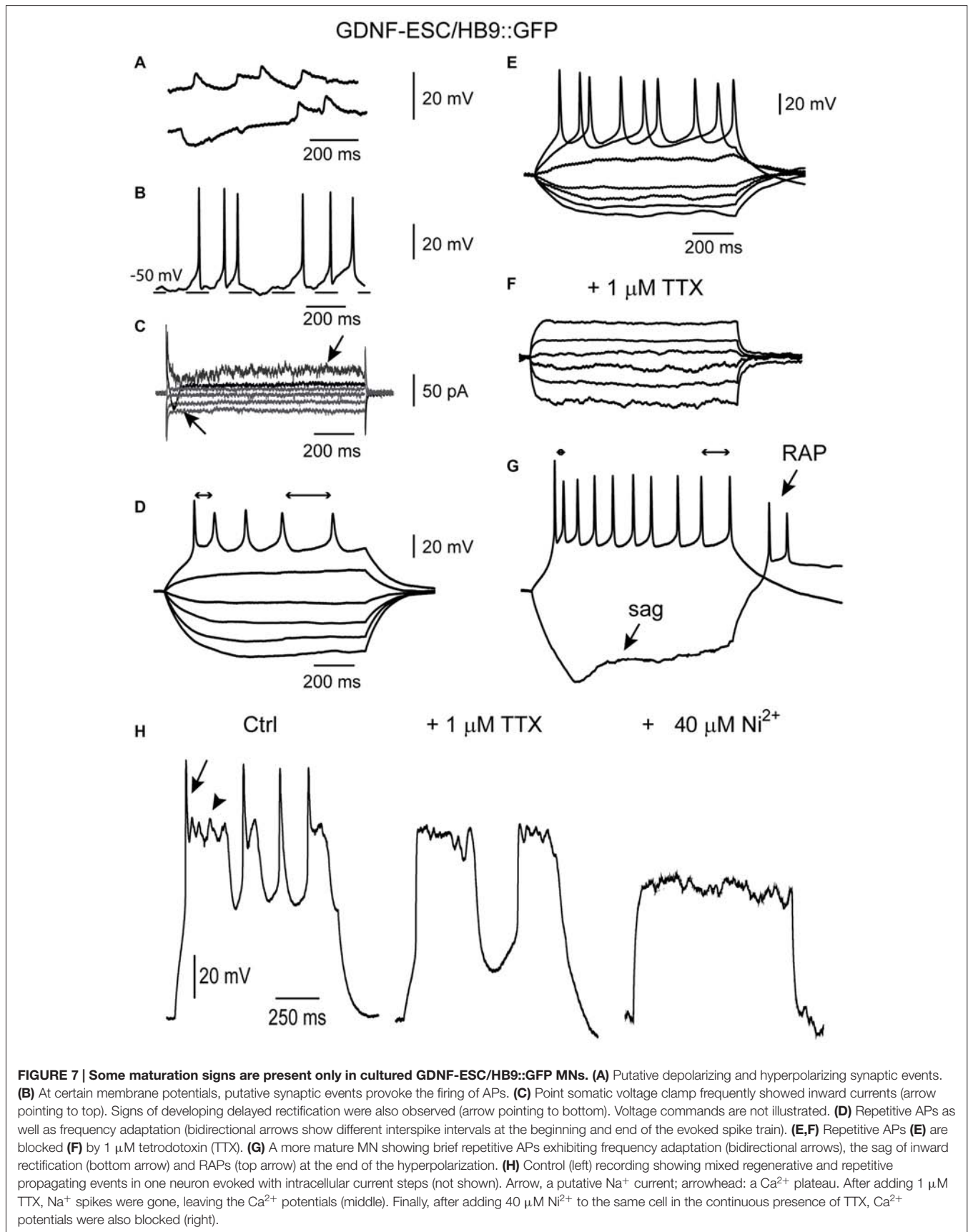
The GDNF-overexpressing ESC lines were capable of robust MN differentiation, but moreover, pluripotency-associated factors such as Oct4 and Sox2 were not altered suggesting that stemness is intact. In differentiation protocols of pluripotent stem cells towards MNs, GDNF is commonly included as a

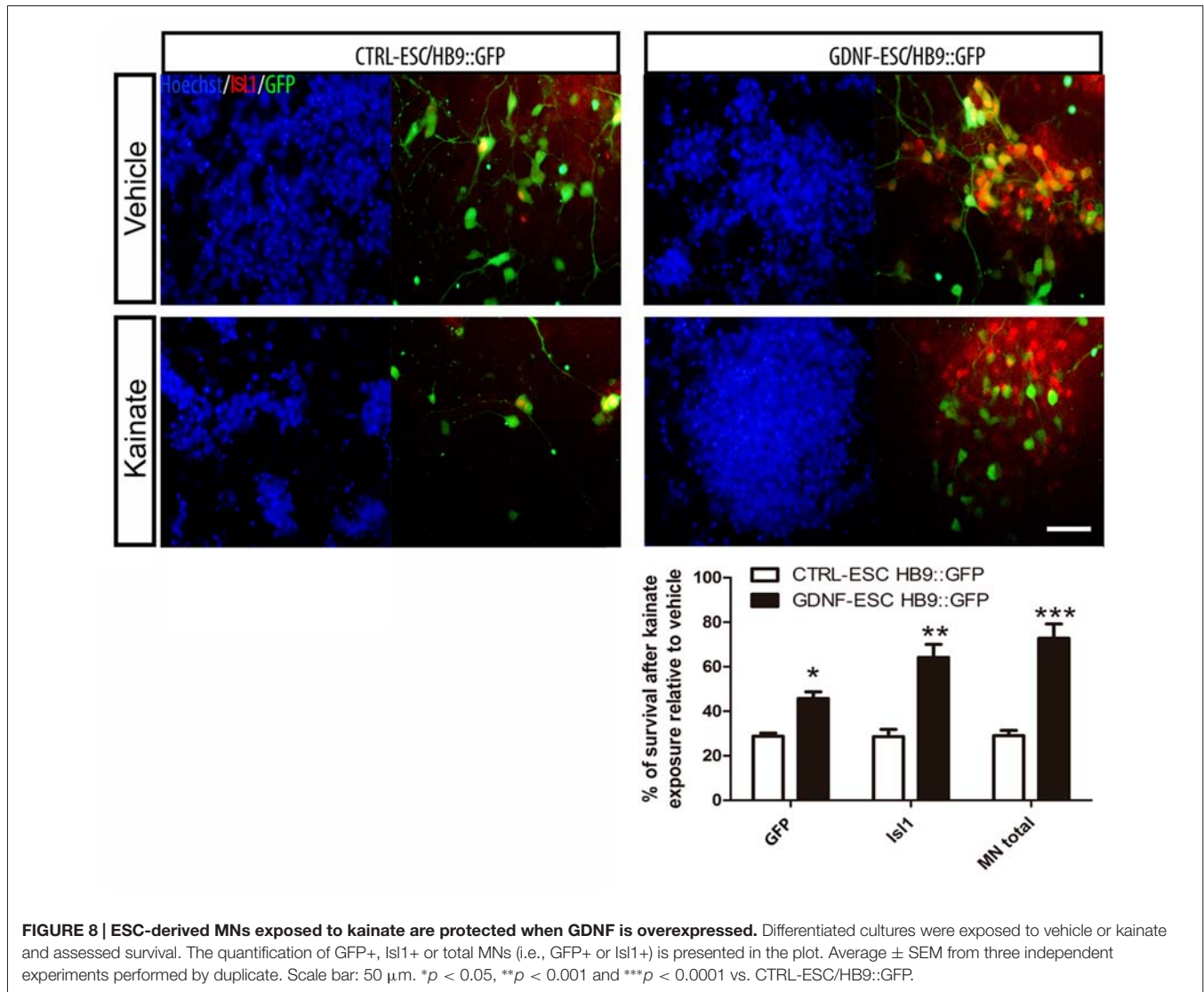


trophic factor for postmitotic MNs. However, whether neural precursors are responsive to GDNF remained an open question. In such case, GDNF would not only impact neuronal survival, but also enhances cell commitment. Our findings suggest that GDNF might be directing the commitment of neurons towards specific phenotypes and not only increasing the survival of neurons; the same question might be addressed for other neurotrophic factors important for MN differentiation or survival such as VEGF.

GDNF and its receptors are expressed in proliferating zones during spinal cord development, and thus GDNF might have additional roles to neuronal survival (Trupp et al., 1995; Treanor et al., 1996; Golden et al., 1999; Homma et al.,

2000). Here, we describe an increase in proliferation that is specific for pMN in GDNF-ESC/HB9::GFP cultures. OLIG2 maintains the pMN cycling by antagonizing the neuronal-promoting action of NGN2; this inhibition abolishes the expression of neuronal genes, including MN transcription factors such as HB9 (Lee et al., 2005). In agreement, a decrease in GFP+ cells was observed at day 5 of EBs in GDNF-ESC/HB9::GFP. A recent study has shown that a cocktail of neurotrophic factors, including GDNF increases the presence of BrdU+ cells, thus raising the total number of MN, but without altering the percentage of differentiated MN from hESC (Lamas et al., 2014). The intriguing observation that exogenous GDNF added transiently in pluripotent ESC





enhanced terminal MN differentiation should stimulate future explorations on the mechanisms triggered by this trophic factor in undifferentiated cells. Neutralizing antibodies against GDNF abolished the positive MN differentiating effect of soluble rhGDNF, which points to a membrane-bound receptor-mediated action.

Regarding MN differentiation, in our experiments GDNF increases the number of MNs, although some subpopulations seem to be favored because GFP-/ISL1+ and GFP+/ISL1+ are augmented relative to control cells. The significant rise in TUJ1+ cells might be due to pMN expansion in the presence of GDNF. In GDNF-ESC/HB9::GFP cultures, practically all neurons are MNs, which can be explained by at least two reasons: (1) GDNF specifies the differentiating cells to become MNs; for instance, GDNF is necessary for the specification of neurons in the dorsal root ganglia (Ernsberger, 2008); or (2) GDNF non-responsive neurons die, leaving a near-total enrichment of MNs in culture; both possibilities are not mutually exclusive. *In vivo*, not all

MNs respond equally to alterations in GDNF signaling. *Gdnf* KO mice present diminished numbers of spinal and facial nuclei MNs (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996). Thus, *Gdnf* KO studies have shown that despite the importance of this gene in the development of motor and other types of neurons, it is not absolutely required for CNS development, since the lack of this protein does not cause major defects; however, the plethora of morphogens and trophic factors switching on and off along development, as well as the spatial constraints in the course of neuronal development, allow the survival of different types MNs in *Gdnf* mutants. Conversely, muscle-specific overexpression of GDNF alters neuron counts and neuromuscular junctions, but not in all nuclei (Buss et al., 2006).

Recently, mESC lines that constitutively express GDNF were reported. In this work (Bryson et al., 2014), mESC engineered to express GFP (under the *HB9* promoter), channelrhodopsin-2 and GDNF were differentiated to MNs.

Notably, MNs expressing GDNF survived longer than the parental cell line. GDNF MNs co-cultured with ESC-derived astrocytes for 7 days were not able to sustain a high frequency of APs after electrical stimulation, similar to MNs derived from CTRL-ESC/HB9::GFP. Only MNs co-cultured with glia for 21–35 days showed a sustained response of APs frequency with increasing depolarizing current, similar to the 9 day-old MNs differentiated from our GDNF-ESC/HB9::GFP, which did not require astrocytes. Such dissimilarities might be explained by the different methods used to produce the transgenic ESC: electroporation (Bryson et al., 2014) vs. lentivirus, and/or the promoter driving *GDNF*: CAG (Bryson et al., 2014) vs. EF1 α . In these previous studies, GDNF does not seem to interfere with the pluripotency program, since their cell lines produced MN and astrocytes (Bryson et al., 2014); we now show that Sox2 and Oct4, important transcription factors associated to the pluripotent state, are expressed GDNF-ESC and CTRL-ESC, previous to differentiation.

Electrophysiological recordings at 9 days *in vitro* showed diverse signs of excitability. Cells with subthreshold local responses (Aidley, 1998) to more mature cells exhibiting repetitive firing, SFA, sag inward rectification and RAPs, when leaving a strong hyperpolarization, were observed (Takazawa et al., 2012). Several of these signs were more pronounced in the GDNF-expressing clones. Recently, fibroblasts were treated with small molecules to directly convert to glutamatergic and GABAergic neurons (Li et al., 2015). Plating of these newborn neurons on astrocytes enhanced functional properties of the membrane. Primary glial or neuronal cells promoted the appearance of spontaneous excitatory postsynaptic currents in about 50% of neurons and produced narrower APs and SFA in the recorded chemically-induced neurons (Li et al., 2015); these electrophysiological features have been associated with maturation during neural development (Spitzer et al., 2000). It is noteworthy that, our GDNF-secreting cells achieved similar maturation, but in the absence of primary astrocytes.

It has been shown that GDNF can modulate acute and chronic changes in excitability via ion channel regulation. In mesencephalic dopamine neurons, GDNF induces inactivation of potassium A currents and increase excitability through a MAP kinase-dependent pathway (Yang et al., 2001). In enteric neurons, GDNF inhibits the delayed inward rectifying potassium current (Zeng et al., 2010). After a nerve section, GDNF treatment promotes a higher level of mRNA of sodium channels correlated with higher conductance in neurons from the dorsal root ganglia (Cummins et al., 2000). In our experiments, GDNF increased MNs excitability and the appearance of other signs of maturation; further studies should establish if similar GDNF-triggered mechanisms are present in ESC-derived MNs.

We believe that our GDNF-ESC lines provide two primary benefits: they exhibit enhanced neuronal differentiation/maturation and if grafted, might provide a constant GDNF delivery by autocrine secretion. However, a note of caution is appropriate, since other work has shown that gene delivery of *GDNF* with lentiviral vectors, applied to rats

with the sciatic nerve section, induces the initial extension of axons towards the source of GDNF. Later, the same motor axons become entrapped (“the candy-store effect”) by local GDNF overexpression, preventing its crossing through the injury site to reach the distal portion, which results in aggravation of the condition, as assessed both morphologically and functionally (Tannemaat et al., 2008; Hoyng et al., 2014). Grafting of these cells is a possible application, because self-secretion of GDNF to MN might enhance its survival after transplantation. In fact, GDNF-expressing MN were grafted in a model of sciatic nerve injury and showed to survive up to 35 days promoting reinnervation (Bryson et al., 2014).

GDNF was first characterized as a protecting molecule for dopaminergic neurons (Lin et al., 1993). *In vitro*, this neuroprotection has been observed when GDNF is added to the media (Meyer et al., 2001), or when co-cultures of GDNF-secreting cells are performed. The *in vivo* administration of GDNF is more complicated and includes perfusion with pumps, multiple injections of virus or co-grafts with other GDNF-secreting cells (Akerud et al., 2001; Deierborg et al., 2008). Neurons that secrete GDNF might have higher survival rates after grafting in animal models of neurodegenerative diseases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DC participated in conception and design, collection and/or assembly or data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript. YR-A, RH-M, and IE-A: collection and/or assembly or data, final approval of manuscript. JB: data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript. IV: financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT CB09/131281 and Red Temática Células Troncales y Medicina Regenerativa) to IV and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (Papiit IN208713 and IN213716 to IV and IN202814 to JB). DC, YR-A, RH-M and IE-A received graduate fellowships from CONACyT and data in this work is part of DC doctoral dissertation in the Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ACKNOWLEDGMENTS

The Islet-1 monoclonal antibodies developed by Thomas M. Jessell and Susan Brenner-Morton were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA. The hGDNF cDNA was a kind gift from Dr. Martha C. Bohn. Primers for detection of *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* were generously provided by the Escalante-Alcalde laboratory. We acknowledge the comments of Dr. Daniel Hoepfner on the manuscript.

REFERENCES

- Aidley, D. J. (1998). *The Physiology of Excitable Cells*. Cambridge, UK; New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Akerud, P., Canals, J. M., Snyder, E. Y., and Arenas, E. (2001). Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 8108–8118.
- Amoroso, M. W., Croft, G. F., Williams, D. J., O'Keefe, S., Carrasco, M. A., Davis, A. R., et al. (2013). Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J. Neurosci.* 33, 574–586. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0906-12.2013
- Angrist, M., Bolk, S., Halushka, M., Lapchak, P. A., and Chakravarti, A. (1996). Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat. Genet.* 14, 341–344. doi: 10.1038/ng1196-341
- Bryson, J. B., Machado, C. B., Crossley, M., Stevenson, D., Bros-Facer, V., Burrone, J., et al. (2014). Optical control of muscle function by transplantation of stem cell-derived motor neurons in mice. *Science* 344, 94–97. doi: 10.1126/science.1248523
- Buss, R. R., Gould, T. W., Ma, J., Vinsant, S., Prevette, D., Winseck, A., et al. (2006). Neuromuscular development in the absence of programmed cell death: phenotypic alteration of motoneurons and muscle. *J. Neurosci.* 26, 13413–13427. doi: 10.1523/jneurosci.3528-06.2006
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z., and Weiss, J. H. (1996). Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury *in vitro*. *J. Neurosci.* 16, 4069–4079.
- Cummins, T. R., Black, J. A., Dib-Hajj, S. D., and Waxman, S. G. (2000). Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 20, 8754–8761.
- de Jesús Aceves, J., Rueda-Orozco, P. E., Hernandez, R., Plata, V., Ibanez-Sandoval, O., Galarraga, E., et al. (2011). Dopaminergic presynaptic modulation of nigral afferents: its role in the generation of recurrent bursting in substantia nigra pars reticulata neurons. *Front. Syst. Neurosci.* 5:6. doi: 10.3389/fnsys.2011.00006
- Deierborg, T., Soulet, D., Roybon, L., Hall, V., and Brundin, P. (2008). Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 85, 407–432. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.001
- Ernsberger, U. (2008). The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons. *Cell Tissue Res.* 333, 353–371. doi: 10.1007/s00441-008-0634-4
- Foran, E., and Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1587–1602. doi: 10.1089/ars.2009.2444
- Golden, J. P., DeMaro, J. A., Osborne, P. A., Milbrandt, J., and Johnson, E. M. Jr. (1999). Expression of neurturin, GDNF and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp. Neurol.* 158, 504–528. doi: 10.1006/exnr.1999.7127
- Guo, G., and Bhat, N. R. (2007). p38 α MAP kinase mediates hypoxia-induced motor neuron cell death: a potential target of minocycline's neuroprotective action. *Neurochem. Res.* 32, 2160–2166. doi: 10.1007/s11064-007-9408-8
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., et al. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360. doi: 10.1007/s004120050256
- Homma, S., Oppenheim, R. W., Yaginuma, H., and Kimura, S. (2000). Expression pattern of GDNF, c-ret and GFR α s suggests novel roles for GDNF ligands during early organogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* 217, 121–137. doi: 10.1006/dbio.1999.9543
- Hoyng, S. A., De Winter, F., Gnani, S., de Boer, R., Boon, L. I., Korvers, L. M., et al. (2014). A comparative morphological, electrophysiological and functional analysis of axon regeneration through peripheral nerve autografts genetically modified to overexpress BDNF, CNTF, GDNF, NGF, NT3 or VEGF. *Exp. Neurol.* 261, 578–593. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.08.002
- Islamov, R. R., Rizvanov, A. A., Mukhamedyarov, M. A., Salafutdinov, I. I., Garanina, E. E., Fedotova, V. Y., et al. (2015). Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule. *Curr. Gene Ther.* 15, 266–276. doi: 10.2174/1566523215666150126122317
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L. A., Boulting, G. L., Moccia, R., Wainger, B. J., et al. (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 14, 781–795. doi: 10.1016/j.stem.2014.03.004
- Krakora, D., Mulcrone, P., Meyer, M., Lewis, C., Bernau, K., Gowing, G., et al. (2013). Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. *Mol. Ther.* 21, 1602–1610. doi: 10.1038/mt.2013.108
- Kruman, I. I., Pedersen, W. A., Springer, J. E., and Mattson, M. P. (1999). ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* 160, 28–39. doi: 10.1006/exnr.1999.7190
- Lamas, N. J., Johnson-Kerner, B., Roybon, L., Kim, Y. A., Garcia-Diaz, A., Wichterle, H., et al. (2014). Neurotrophic requirements of human motor neurons defined using amplified and purified stem cell-derived cultures. *PLoS One* 9:e110324. doi: 10.1371/journal.pone.0110324
- Lee, S. K., Lee, B., Ruiz, E. C., and Pfaff, S. L. (2005). Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev.* 19, 282–294. doi: 10.1101/gad.1257105
- Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., et al. (2015). Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell* 17, 195–203. doi: 10.1016/j.stem.2015.06.003
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130–1132. doi: 10.1126/science.8493557
- López-González, R., Camacho-Arroyo, I., and Velasco, I. (2011). Progesterone and 17 β -estradiol increase differentiation of mouse embryonic stem cells to motor neurons. *IUBMB Life* 63, 930–939. doi: 10.1002/iub.560
- López-González, R., Kunckles, P., and Velasco, I. (2009). Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Cell Transplant.* 18, 1171–1181. doi: 10.3727/096368909x12483162197123
- Meyer, M., Matarredona, E. R., Seiler, R. W., Zimmer, J., and Widmer, H. R. (2001). Additive effect of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 on rat fetal nigral explant cultures. *Neuroscience* 108, 273–284. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00418-3
- Miles, G. B., Yohn, D. C., Wichterle, H., Jessell, T. M., Rafuse, V. F., and Brownstone, R. M. (2004). Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J. Neurosci.* 24, 7848–7858. doi: 10.1523/jneurosci.1972-04.2004
- Moore, M. W., Klein, R. D., Fariñas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., et al. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76–79. doi: 10.1038/382076a0
- Mount, H. T., Dean, D. O., Alberch, J., Dreyfus, C. F., and Black, I. B. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 9092–9096.
- Oppenheim, R. W., Houenou, L. J., Johnson, J. E., Lin, L. F., Li, L., Lo, A. C., et al. (1995). Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373, 344–346. doi: 10.1038/373344a0
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., et al. (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 73–76. doi: 10.1038/382073a0
- Rakowicz, W. P., Staples, C. S., Milbrandt, J., Brunstrom, J. E., and Johnson, E. M. Jr. (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture. *J. Neurosci.* 22, 3953–3962.
- Rodríguez-Martínez, G., Molina-Hernández, A., and Velasco, I. (2012). Activin A promotes neuronal differentiation of cerebrocortical neural progenitor cells. *PLoS One* 7:e43797. doi: 10.1371/journal.pone.0043797
- Rosenblad, C., Kirik, D., and Bjorklund, A. (2000). Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Exp. Neurol.* 161, 503–516. doi: 10.1006/exnr.1999.7296

- Spitzer, N. C., Vincent, A., and Lautermilch, N. J. (2000). Differentiation of electrical excitability in motoneurons. *Brain Res. Bull.* 53, 547–552. doi: 10.1016/s0361-9230(00)00388-9
- Takazawa, T., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Studer, L., Wichterle, H., and Macdermott, A. B. (2012). Maturation of spinal motor neurons derived from human embryonic stem cells. *PLoS One* 7:e40154. doi: 10.1371/journal.pone.0040154
- Tannemaat, M. R., Eggers, R., Hendriks, W. T., de Ruiter, G. C., van Heerikhuizen, J. J., Pool, C. W., et al. (2008). Differential effects of lentiviral vector-mediated overexpression of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on regenerating sensory and motor axons in the transected peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1467–1479. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06452.x
- Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., et al. (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382, 80–83. doi: 10.1038/382080a0
- Trupp, M., Rydén, M., Jörnvall, H., Funakoshi, H., Timmusk, T., Arenas, E., et al. (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J. Cell Biol.* 130, 137–148. doi: 10.1083/jcb.130.1.137
- Vilchis, C., Bargas, J., Ayala, G. X., Galvan, E., and Galarraga, E. (2000). Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95, 745–752.
- Wang, C. Y., Yang, F., He, X., Chow, A., Du, J., Russell, J. T., et al. (2001). Ca²⁺ binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca²⁺ channels and transmitter release. *Neuron* 32, 99–112.
- Wang, C. Y., Yang, F., He, X. P., Je, H. S., Zhou, J. Z., Eckermann, K., et al. (2002). Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J. Biol. Chem.* 277, 10614–10625. doi: 10.1074/jbc.M106116200
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385–397.
- Yang, F., Feng, L., Zheng, F., Johnson, S. W., Du, J., Shen, L., et al. (2001). GDNF acutely modulates excitability and A-type K⁺ channels in midbrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1071–1078. doi: 10.1038/nn734
- Yang, L. X., and Nelson, P. G. (2004). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulates the distribution of acetylcholine receptors in mouse primary skeletal muscle cells. *Neuroscience* 128, 497–509. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.06.067
- Zeng, F., Watson, R. P., and Nash, M. S. (2010). Glial cell-derived neurotrophic factor enhances synaptic communication and 5-hydroxytryptamine 3a receptor expression in enteric neurons. *Gastroenterology* 138, 1491–1501. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.048

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Cortés, Robledo-Arratia, Hernández-Martínez, Escobedo-Ávila, Bargas and Velasco. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Anexo II ARTÍCULO DE REVISIÓN EN PUBLICACIÓN: The non-survival effects of GDNF in neurons

The Non-survival effects of GDNF in neurons

ABSTRACT

The Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) was firstly characterized as a survival-promoting factor for dopaminergic neuron; afterwards, it was discovered that other cells are also responsive to GDNF not only as a survival factor but it could support other cellular functions such as proliferation, differentiation, maturation, neuritic outgrowth and other phenomena less studied than survival and now more extendedly exposed here in this review. During development, GDNF favors the commitment of neural precursors towards dopaminergic, motor, enteric and adrenal neurons, besides the axonal growth of some of these neurons. GDNF also induces the acquisition of a dopaminergic phenotype by increasing the expression of tyrosine hydroxylase, Nurr1 and other proteins that confer this identity and further dendritic and electrical maturation. In motor neurons, GDNF not only promotes proliferation and maturation but also participates in regeneration of axonal damage and modulates the neuromuscular junction at both presynaptic and postsynaptic level. Even GDNF can modulate the proliferation rate of neuroblastoma and glioblastoma cancer cells. Furthermore, there are conditions such as depression, pain, muscular soreness among others where GDNF presence or absence correlates with the aforementioned illnesses, and despite the fact that the exact role of GDNF is unknown, it is not survival-mediated. The understanding of the whole range of properties of this trophic molecule could allow us to open the action range in order to accelerate and/or improve those therapies.

INTRODUCTION

The glial-cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a protein initially characterized as a soluble factor extracted from the conditioned media of *striatum* astrocytes and once purified, promoted the survival of dopaminergic neurons (DANs) in culture[1]. Afterwards, it was discovered that DANs are not the only responsive cells, but many others could be target of this trophic factor, even outside the central nervous system (CNS). For example, GDNF absence produces renal agenesis [2-4]. In the nervous system, other cells that are responsive to GDNF include cerebellar [5, 6], hippocampal [7, 8], sensory [9] cortical [10], spinal motor (MNs) [11] and enteric [2] neurons.

The mechanisms for the survival-promoting actions of GDNF have been widely studied; but other effects triggered by this factor remain unidentified [12, 13]; for instance, the expression pattern of mRNA [14, 15], protein [16, 17] or receptors [18] for GDNF, suggest additional roles before its survival effects. In fact, new functions associated to changes in gene expression of downstream effectors, were recently described such as promotion of proliferation and specification, neurite growth, synaptic and electrophysiological maturation, soma expansion and expression of phenotype-specific proteins. Additionally GDNF might participate in both homeostasis and pathophysiological states. Because most of the GDNF-associated work has been centered on

promotion of neuronal survival, and the body of this knowledge is enormous, this review does not cover neuroprotection, but we aim to review the non-survival effects of GDNF.

GDNF EFFECTS ON DIFERENT SCENARIOS

During development, the GDNF expression and its receptors can shed light on the function according to the place and stage of expression. This is how some authors have studied early stages of neural development E7.5-E10.5 and later when postmitotic neurons appear E10.5-E15.5 [19].

On the early stages, in the forming neural plate, the primary and secondary neurulation end at 9.5 in mouse [20]. During this same period, neural precursors are still proliferating and starting to acquire a regional commitment; however, there are neither postmitotic neurons nor axons sprouting yet; thus, the neuronal survival associated to trophic factors such as NGF, GDNF, NT-3 and others is not present up to this point; any factor existent at this time should be acting on other functions rather than neuronal survival. By using *in situ* hybridization, the mRNA of *Gdnf* could be detected since E7.5 (the earliest stage analyzed) and reach the highest level at E9.5, then coming down at E10.5. In these early stages, RNA expression is uniquely present in the forming neural tube; initially, on the region corresponding to the forebrain and later on the midbrain and finally to the whole neural tube, mainly dorsal regions (Fig. 1A). Although this review does not pretend to cover the extraneural functions of GDNF, it is important to mention that from E10.5 to E15.5 (latest stages analyzed), the regions where GDNF expresses are mainly extraneural, except for two little regions on the hindbrain (Fig. 1B). But it is also important to notice that this is a period where axons grow along the body, in some cases, mesenchymal tissue (such as limb buds) will be in direct contact with axons, in other cases, the mesoderm will direct the regionalization of neural tissue (such as lateral somites), so GDNF seems no longer necessary in the neural tissue but in its target zones. In the same manner and in later stages, muscles express GDNF which could help to drive MNs axons that during these stages start to send axons to their muscular targets.

A great deal of non-neural tissues express GDNF during this developmental stage, when postmitotic neurons start to appear and organogenesis is at maximum activity; in some cases as in the kidney, this expression is associated with epithelial-mesenchymal interactions and the absence of this gene delivers renal agenesis [21]. On the contrary case, the gut with expression of GDNF since E9.5 and highest at E11.5 have an extensive nervous plexus almost autonomous and this trophic factor participates in its development; the absence of the signaling complex generates lack of this plexus and Hirschsprung disease [22]. Many other organs with a much more modest innervation but also requiring motor visceral, sympathetic and parasympathetic innervation have to attract those axons; it would be interesting to study in which cases GDNF is participating. Both epithelial-mesenchymal interactions and neurogenesis are not mutually exclusive as seen in gut formation. Trupp has shown there are patterns of GDNF expression in target organs for sensory neurons and for the first time suggested that it could be working in attracting nascent axons[9]. Despite there are GDNF KO studies, this phenomenon has not been studied deeply enough, except for evident alterations such as cervical sympathetic ganglia [2] or sympathetic trigeminus [23] but not in other organs that express GDNF. Accordingly, Pitchel shows that GFR α 1 is already expressed in neuroblast which will innervate several organs [4]. The effects on the absence of GDNF might not be very noticeable because redundant signals or because the organ can deal without such innervation.

GDNF signals canonically via GFR α 1 and the coreceptor RET; however, there is no absolute need for both of them to be in the same cell (*cis*) but they can transduce in *trans* [24]. Examples of the latter exist in vibrissae innervated by the trigeminal nerve, the lateral septum and CA3 of the

hippocampus and the fourth layer of the cortex and thalamus [25]. In this way GDNF might be acting as a chemoattractant molecule. On the other hand and in later stages, the expression of GDNF is also differential in space and time; this means, for short periods it is expressed in particular places to be turned off and then turned on in others. It is noteworthy that this phenomenon takes place when the maximum rate of axonal and dendritic growth is happening in the sensorimotor and visual cortex, both capable of signal through GDNF at this stage [26]. It is also known that MNs during development have temporal windows of responsiveness then lose it and regain it once more just in a selected group of MNs [27]. A possible explanation for this is that GDNF turns on where GDNF-sensitive axons are passing through them, shut down and turn on in the next section until they reach their target cells; if GDNF is locally and continually secreted where axons have to cross but not to form synapses; these axons will become entrapped by local GDNF expression preventing its crossing and going farther; this has been called “the candy-store effect” [28, 29]; however this is a long shot that should be proved. Ikeda attested that GDNF is expressed in zones where axons do not establish synaptic contacts but cross through such as the corpus callosum; another explanation might be that the presence in such places is repellent but in any case this must be studied [26]. If gene-expression associated with GDNF signaling is analyzed, the function of the genes correlates with the effects mentioned so far. Overexpression of GDNF in a neural precursor cell line regulates 283 genes (43 specific to GDNF compared to CNTF). GDNF down-regulates cortex layer development, cytoskeletal reorganization and axonal stabilization but up-regulates extracellular proteins and cell surface proteins, axonal sprouting, neurite outgrowth, spine formation; and so these cells can sense the extracellular environment. Therefore GDNF regulates migration, differentiation and axonal guidance as well [30]. Functional studies are ongoing to corroborate these effects on axonal guidance and migration to be used in regenerative medicine ([31-33] for possible treatment in nerve injury; there are several reviews on this matter [34-36]

DOPAMINERGIC NEURONS

The initial characterization of GDNF was carried on in midbrain dopaminergic cultures; from this seminal article, several new authors have studied how this factor may modulate other cellular functions. In those original reports GDNF not only promoted DANs survival but soma enlargement and neurite outgrowth. Since then, new features such as proliferation, maturation and long-term effects have been taken into consideration besides survival-promoting properties (Fig. 2).

-embryonic midbrain-derived DA neurons

Previous studies have demonstrated survival and differentiating-actions on embryonic DANs by BDNF, TGF α , FGF, NT-3, NT-4/5, EGF, PDGF, IGF, IL-6, most of the times all together or in several combinations, but which of these factors are surviving and which are differentiating factors? Are they interchangeable? The precise answer it is not completely uncovered; what it is known is that BDNF, NT's and GDNF act directly on DANs, the rest of the factors act on developing mesencephalic glia [37-39]. Accordingly, culturing neural stem/precursor cells obtained from the ventral midbrain (the area where mesencephalic DANs are born) in the presence of GDNF promotes the expansion of dividing neural precursors measured by nestin-positive cells and by an increase in neurosphere diameter, however this latter increase may be also associated with an antiapoptotic response since Bcl-2 is up-regulated and caspase-3 is down-regulated (Fig. 2) [40]. Ling and cols in their culture conditions have a yield of no more than 5% of Tyrosine hydroxylase

(TH)-positive cells, the limiting-rate enzyme in the dopamine-biosynthesis pathway present in DANs. Addition of conditioned-media with mononuclear cells supernatant allows an increase in TH immunoreactive cells, this is caused by LIF and IL-1 present in the media; nonetheless, the morphology of this TH+ cells are far from DANs morphology. It is not until GDNF is added to the culture that neurites emerge, besides a further increase in TH+ cells [41]. Contrary to this Roussa and cols found that GDNF does not increase TH expression; nevertheless, it did increase the expression of Pitx3 [42], a transcriptional factor that is part of a regulatory complex that maintains the DANs phenotype. Now it is known that Nurr1 induces the expression of the co-receptor for GDNF, c-RET, allowing the signaling of this factor and then up-regulating Pitx3 [43] while GDNF also regulates DAT activity [44] (Fig. 2). The discrepancy among these and other authors could be attributed to different mixtures of trophic factors added during proliferation/differentiation. Another possibility might lay on the different selected stages to perform the studies, since in E12-14 dopamine synthesizing enzymes are barely detectable compare to later stages [45]. In any case GDNF participates in proliferation and the acquisition of a dopaminergic phenotype. How this and other factors interact to promote this phenotype is still a matter of study.

Parallely, the outgrowth of the dendritic tree couples the electrophysiological maturation which in turn promotes dopamine release after potassium stimulation [46] and GDNF also modulates excitability in an acute fashion by inhibiting A-type K⁺ channels; effect that is ERK-mediated [47]. Microarrays have corroborate that the GDNF signaling favors the expression of dopamine-biosynthesis pathway and recapture, ERK ½ signaling pathway and calcineurin expression [48] (Fig. 2).

Adult ventral midbrain-derived neurons

It has been uncovered that GDNF promotes the acquisition of additional terminal differentiation markers. This mechanism for commitment can include the up-regulation of Delta-like 1 (Dlk1) homologue, since injection of GDNF-expressing virus in the adult striatum increased four-fold its expression in the ventral midbrain. Dlk1 is expressed in the developing mouse ventral midbrain and its overexpression in human cells allowed the expression of TH [49] (Fig. 2). This suggests that GDNF might be directing the commitment of neurons towards specific phenotypes and not only increasing the survival of neurons.

Once DANs have developed and established connections throughout embryonal stages, is during postnatal periods that terminal maturation events can be studied and whether GDNF has any potential effect in this matter. In rat postnatal DANs, GDNF increases dopamine release *in vivo* [50]; an increase in quantal size in cell cultures [51]; and an increase in the amplitude of autaptic excitatory currents, frequency of miniature autaptic currents and evoked potentials. All these features correlate with a higher number of synaptic terminals [52]. Experiments such as previously described show that GDNF is able to modify the synaptic anatomy and favor the electrophysiological maturation.

-ESC-derived

Embryonic stem cells are able to differentiate into tissues derived from the 3 embryonic layers under specific conditions and they are capable of produce a complete organism (except for the extraembryonic tissue) and become fertile. These cells have been used to study differentiation processes *in vitro* emulating what occurs during normal development. Rollestetec and cols. agree that a cocktail of factors which includes GDNF promotes the expression of pro-dopaminergic genes such as Nurr1 and TH [53]. Nurr1 is expressed since E10 in the ventral midbrain just prior to the

appearance of TH + cells and activates the TH promoter. In such case the survival-promoting factors are differentiating-factors as well since they induce transcriptional factors (such as Nurr1). These effects have been corroborated in cultures of ESC on stromal PA6 cells (a well-known cell line able to induce neurons from ESC) plus GDNF, in this case, addition of GDNF increases TH immunoreactivity [54]. Similarly to dopaminergic induction by PA6, coculture of cynomolgus monkey-derived ESC on Sertolli cells is able to simple and reliable yield a high number of DANs (60% TH+/TUJ1+) in only 3 weeks and with no further additions of any kind of factor and the differentiation procedure is more efficient than on PA6 cells. It is also known that Sertolli cells secrete GDNF and using GDNF-neutralizing antibodies diminish in half the differentiation power that these cells have over ESC [55], which indicates that physical contact is also needed. Such is the effect of this trophic factor that GDNF-secreting NPC have been generated. These cells promote differentiation of cocultured ESC-derived neural precursors into NDAs [56]. Other studies have revealed that in human ESC, GDNF is able to promote the dopaminergic differentiation efficiently by itself [57]. They generated 50.5% of TH+ cells, after 21 days in culture, which is a shorter time compared to other protocols. GDNF increased Pitx3, Vmat, DAT, D1, D4 and D5 receptors and released dopamine [57] (Fig. 2).

MOTOR NEURONS AND SPINAL CHORD

One of the most important targets for GDNF are the MNs, this relevance relies on the relative great population of MNs in the CNS and second, every one of them depends on GDNF at least for a brief period of time during development. This kind of neurons is so diverse that each group responds with singularity before GDNF. MNs from the ventral mesencephalon increase the activity of Choline acetyl transferase (ChaT) and the soma size when exposed to GDNF [58]. In the same fashion, neurites acquire complexity, while these effects are synergistic with CNTF and BDNF. These are motor cranial pair-belonging neurons which are different from other ChaT+ cells not responsive to GDNF and its location is more caudal in the pedunculo-pontine nucleus [58]. Other experiments already classic, have shown a more robust muscular innervation, delay synaptic elimination, spontaneous neurotransmitter release and axonal branching in the presence of GDNF [59-61]. Despite more neuromuscular junctions, motor function is not improved probably associated with the type of innervation reported which is a gamma type, a proprioceptive neuromuscular connection not directly involved in contraction [62].

The trophic theory dictates that in the course of embryonic development, excess of neurons needed in adult life are created and merely the few which find any trophic molecule (which are scarce) and establish optimal contacts with their target cells will survive, the rest will undergo programmed cell death. Buss and cols show the role GDNF has as a trophic molecule thru the massive death period by doing experiments of GDNF-overexpression (*MyoGdnf*) only in the target cells of MNs, this is the myocytes. In this work GDNF halts, at least partially the death of MNs allowing them to form neuromuscular junctions (NMJ), however, somas and neurites were of abnormal size. This is associated with a shift towards gamma and small alpha neurons in accordance with has been previously described [63, 64]. Recently we proved that GDNF-overexpression in ESC increases the mitotic rate of MN-committed neural precursors(Olig2+) [65]. Olig2 promotes the replication of MN precursors (pMN) and avoids the early expression of proneural factors such as Neurogenin 2 and even HB9 which is a pro-MN factor and so it halts the closure of mitosis. [66]. Hence, GDNF is directly or indirectly increasing the Olig2 expression and promoting the replication of pMN (Fig. 3). We also proved that undifferentiated ESC exposed to

GDNF yield a higher number of MNs than exposure during development or at the end of it; despite this was an unexpected result it is not unlikely since ESC expressed GFR α 1 and RET receptors [65]. During development and in early stages in the ventral neural tube when the neural precursors are leaving the cell cycle it can be observed the expression of GDNF receptors [67]. According to this Shimada demonstrated that GFR α 1 is up-regulated by Ascl1, NeuroM and Ngn2 in the ventral neural tube; in spite of this, each one of these factors are mutually exclusive, since any one of them marks a temporary window in development where the most precocious of them is Ascl1 when pMN are proliferating [68]. Putting all the pieces together, GDNF seems to allow the support at least temporarily of pMN cycling during development until the balance of Ngn2 and Hb9 overthrow Olig2 and mitosis is left behind. At this point the young postmitotic neurons must mature electrically. In that same work we demonstrated that GDNF constitutively expressed in ESC-derived MN promotes the maturation since they increased evoked and spontaneous action potentials, delay inactivation and electrical signatures of MNs such as sag or I-H current, rebound action potential and spike frequency adaptation [65].

The injury to MN axons has been widely studied and with survival promoting effects of GDNF it is the second most studied effect of this trophic factor. New studies have been focused in nanomaterials as scaffolds to deliver proper amounts of GDNF in time and space to promote, for instance sciatic nerve recovery [69], recurrent laryngeal nerve [70, 71] dorsal root and spinal cord slices [31].

The diversity of actions of GDNF are so finely-tuned in space that the binding of GDNF to synapse or soma elicits different responses, if the factor binds to the soma promotes cell survival, but if attaches to distal neurite facilitates axon outgrowth [72]. It is remarkable how cells can control signals in such a meticulous way. Most probably several other trophic factors are control in the same fashion

MYOCYTES

Despite the obvious fact that myocytes are not neurons, the intimacy of these cells with the nervous system and since the main way of our nervous system to interact with the environment is via motor activity (either autonomic or voluntary) orchestrated by the CNS and specially and finally by MNs we briefly reviewed the role of GDNF in these cells which has been less analyzed. Muscular cells which are the target of MNs also suffer changes associated with the presence of GDNF where both of them interact, this is, the NMJ. In this case it has been observed that the presence of GDNF in muscular cultures induces an accumulation of acetyl choline receptors, and if muscle is cocultured with MNs this aggregation is focused on the membrane facing the NMJ (Fig. 3). This array of receptors is not *de novo* synthesis but a rearrangement of proteins via MAPK, Src and cAMP [73]. GDNF is a protein with several gene targets, but in the latter work *de novo* synthesis could not be detected, this might be due to the short time analyzed (8 hours max.); modification on expression of MNs genes such as Ach biosynthetic pathway might need some extra-time. Huang and cols have shown that NMJ development is highly associated with GDNF since this factor modifies the amplitude of spontaneous potentials of the terminal plate which can also be involved in postsynaptic receptor density [74]. We recently found that muscular precursors that secrete GDNF differentiate more efficiently, mature better and faster and survive further days *in vitro* by lowering the apoptotic pathway (Cortés personal communication)

Beside the direct effects on MNs, GDNF also upgrades the synaptic communications which strengthens the structure and function of the NMJ. In *X. Laevis*, GDNF facilitates NMJ development by increasing total number of neurites, synaptic vesicle clustering, quantal size and synaptic

transmission [75]. It would be equally interesting to know whether the effects of GDNF found between this binomial is also present in the postsynaptic moiety in other sensitive neurons to this factor. Buss reveals there is a change in the muscular phenotype if GDNF is overexpressed in muscle at embryonic stages, since there is an increase in the number of type IIa fibers (fast-twitch fatigue-resistant) which also correlates in functional tests of muscular tetany. All these changes need a rearrangement of gene expression from type I to type IIa fibers (Fig. 3). However intrafusal fibers which are highly sensitive to GDNF are not modified probably because despite gamma neurons grow in numbers, the proprioceptive afferent neurons that also must contact intrafusal fibers does not increase, both of them needed to get a functional circuitry. Functionally *MyoGdnf* animals poses alterations in equilibrium, total strength and muscular mass [62]. GDNF also possess the capacity to promote axonal regeneration due to liberation of this trophic factor from stimulated muscle. The transection of tibial nerve and electrical stimulation of tibial muscle induces the transcription of GDNF which was associated with reinnervation and function recovery [76]. The amyloid precursor protein (APP) which was first described as part of the pathophysiology of Alzheimer disease lacked a physiological known role in the organism. Stanga and cols show that GDNF is directly induced by APP in muscle cells and modulates the NMJ development affecting muscular strength and both neuron and myocyte differentiation, depletion of APP diminished the expression of GDNF [77]. Does APP regulate the expression of GDNF in other neuronal sites within the CNS and how GDNF expression is related in APP and Alzheimer disease? These are two important questions beyond the scope of this review.

The delicate balance among different muscular types, neurons, trophic and signaling molecules must be tightly regulated in order to reach a proper function of all its parts.

ENTERIC NERVOUS SYSTEM

The neurons that control the peristaltic movement and secretion of digestive tube arise from neural crest; the rostral crest innervates first portions of esophagus; vagal crest until umbilical division and from there until it ends, the sacral crest. When these cells arrive to the gut they are multipotent and highly express RET. Chalazonitis observed that these precursors proliferate in the presence of GDNF at E12 stage but not at E14 or E16; instead at this period this factor inhibits glial differentiation and at the same time induces the expression of TrkC, the main receptor for NT-3 (Fig. 3). Remarkably, these precursors do not express GFR α 1, hence it is necessary the interaction with this molecule *in trans* in other cells to present GDNF. This is a process well-known in epithelial-mesenchymal interaction [78]. As it is also known the absence of GDNF during development produces the absence of enteric nervous system (ENS) [2-4, 23]. This seems that it is not because of a lack of trophic support but rather an absence of expansion/induction of a particular phenotype. Besides RET is also a dependence receptor, which means that there is a signal output both if the ligand is bound or not [79]; in this case, GDNF bound to RET induces proliferation and RET without GDNF apoptosis as in Hirschprung disease; both mechanisms may be associated in GDNF KO-associated lack of ENS.

In later stages of development, GDNF has a minimal role as a survival factor which in turn it is taken by NT-3 [78]; because the absence of this trophic factor diminishes the final number of enteric neurons in the bowel [80] however this affection is not as severe as in GDNF KO. Complementary experiments eliminating RET has been performed; this receptor is expressed in neural crest derivatives which will give rise to the ENS and it is present even before the precursors enter the gut. At these early stages NC precursors are highly responsive to GDNF and in its presence incorporate BrdU which translates in cellular proliferation [81]. In the developed ENS,

GDNF promotes delayed-inward rectification potassium channels, histamine receptor expression and overall synaptogenesis

OTHER GDNF-RESPONSIVE CELLS

It seems that practically all neural crest-derived neurons are responsive to GDNF at any time point during its ontology. Chromoaffin cells from the adrenal medulla differentiate and develop when GDNF is present *in trans*. In this case TGF β sensitizes the cells to GDNF [82]. Kohno and cols have developed an immortalized cell line from adrenal medulla called tsAM5NE in which GDNF induces proliferation and neural differentiation (Fig. 3). Similar to what happens with NT-3 in ENS, GDNF bring the expression up of gp130, the LIF receptor, and the addition of this factor promotes further maturation [83]. Other neurons sensitive to GDNF with effects beyond survival but less studied are neurons from the superior cervical ganglion [84] and dorsal root ganglia [85, 86]. In the latter case sensory neurons in DRG increase the expression of Na⁺ channel mRNA when nerve is transected and GDNF is applied [87].

Neuroblastoma (NB) is a neural crest-derived tumor that usually arises from the adrenal gland; it is composed by a neuron and glia mixture, plus highly mitotic cells. RET is present in NB and induces differentiation in some kind of tumors, depending whether they have low or high expression of RET. GDNF arrests NB cells in G0/G1, and enhances CNTF-induced Trka expression. These three signals collaborate to decrease the expression of N-myc thereby inhibiting proliferation, increasing G0 cells and decreasing S cells in HTLA 230 NB cells as well and further expression of neuron-specific proteins such as SSCG10 [88]. So neuroblastomas can be divided in good and bad prognosis according to GDNF responsiveness. In a similar fashion, Baldassarre indicates that GDNF induces expression of the CDK inhibitor p27kip1 halting proliferation in embryonal carcinoma cell line NT2/D1 [89]. It is interesting to notice that embryonic cells already respond to GDNF. On the other hand, rat C6 glioma cell line, up-regulates ki67, PCNA and cyclins in the presence of GDNF [90]. Anyway the GDNF action on proliferation/differentiation seems to be not just dependent on the cell type but the developmental stage or the particular phenotype hereby represented by the different cell lines. What is the expression and/or epigenetic profile among different tumor cells with different responses to GDNF? The answer could shed light into possible therapeutic targets.

OTHER STUDIES

GDNF has been studied in several neural functions or pathologies whether the role that this neurotrophin plays is not clear. An example of this is attention-deficit/hyperactivity disorder in which the disease is associated with high levels of GDNF and NT-3 in serum [91, 92].

In other pathology, major depressive disorder, in which among the many theories associated with, the neurotrophic hypothesis argues that an imbalance of these factors alters primarily neurogenesis and generates depression. In this regard the most substantial evidence of GDNF involvement in this pathology is low levels of peripheral GDNF [93, 94]; nevertheless, alterations in the receptors and signaling pathway have been also reported. The micro-RNA miR-511 down-regulates the isoform GFR α 1a but not the GFR α 1a, this imbalance in ratio alters the behavior of basolateral amygdala neurons inhibiting neuroplasticity [95]. How this low GDNF is associated with this disorder it is not completely understood and if this alteration is a cause or an effect of the illness.

Pain is present in many diseases as an unspecific symptom; however, neuropathic pain poses particular characteristics and the etiology lays directly within the neurons. GDNF has proved in animal models to modulate this pain, but effective methods of delivery are still on trials [96]. What are the cellular mechanisms involving this factor it is not completely known but it seems that controls excitability and glutamate release [97] even under physiological conditions [96]. Anatomically, GDNF modulates pain at least in part, in a subpopulation of peptidergic neurons in DRG of small and medium size which express calcitonin gene-related peptide and somatostatin. These neurons move GDNF anterogradely to the dorsal horn of spinal cord [98]. Locus coeruleus is the most important pain-modulator in the brain, GDNF modulates noradrenaline content in the spinal cord from locus coeruleus, and promotes analgesia in a chronic constriction injury model [99]. Hence GDNF can modulate pain at different levels (Fig. 3).

Delayed-onset of muscular soreness (DOMS) which almost everyone has experienced once in his/her life is thought to be caused by lactic acid accumulation (now disregarded) and microruptures of muscular fibrils [100] but new mechanisms associated with inflammation have been discovered. Eccentric contraction induces activation of Cox-2 and this triggers GDNF release from satellite cells, which are the muscular stem cells, and GDNF sensitizes A δ sensory fibers. Inhibition of Cox-2 or administration of anti-GDNF diminishes DOMS (Fig. 3). [101] Maybe anti-GDNF as DOMS treatment is not the best approach but Cox-2 inhibition is widely used and highly effective [102]; besides, this might be, at least in part the mechanism by which muscle get hypertrophic after exercise, by GDNF signaling which correlates with our findings of GDNF-mediated muscular development (Cortes personal communication).

Transdifferentiation has been widely studied in order to avoid ethical or reprogramming issues such as the use of ESC or iPSC respectively. In this regard, acquisition of neuronal phenotype has been achieved from fibroblast using transcription factors [103] or small molecules [104]. However trophic factors were never essential. Zhu and cols transdifferentiated MSC into neurons by overexpressing GDNF and NT-3 in fetal gut culture medium. Neuronal markers and Na and K currents were detected [105]. This proved that GDNF and NT-3 can also modulate the epigenetic landscape but how exactly do this, it is still a task to tackle.

CONCLUSIONS

GDNF was initially described as a molecule with a specific action, to promote the survival of a particular subset of cells, the midbrain DANs. Since this first description, several neural and non-neural lineages have proved to be responsive to GDNF; besides, the properties driven by this growth factor are beyond survival and what primarily was presented as particular, now it is quite pleiotropic. By this means GDNF has entered the group of molecules that participate in a great variety of cellular functions; molecules such as TGF β , Interleucins, FGF, etc. and so GDNF function only can be referred under a specific context; however, it is also true that there are effects such as differentiation, maturation and survival that conceptually are different but in reality is difficult to find one separated from another. For instance, in the same space and time GDNF favors the expression of dopaminergic markers and survival-promoting proteins such as Bcl-2 [40, 53]. In this review it was not taken in account the GDNF effects on epithelial-mesenchymal interactions, as in the kidney formation, ENS, and in craniofacial derivatives from the branchial arches. This remarks the importance of GDNF during organogenesis in several systems in the organism.

We can always wonder which factor or what cocktail of factors is better; but a better question might be which combination in time, space and manner is better for this or that phenotype. This

question has been partially studied in stem cell-derived neural differentiation protocols [106-110]; however and as it is reported, the response to these factors is spatiotemporal, very different as it is used in “differentiation cocktails”, all added all simultaneously. Dissecting the effect that each one of the involved trophic factors is part of the route to fully understand differentiation processes, an example of this is the unique role that GDNF plays during ESC-derived MNs differentiation [65].

It is unquestionable now that GDNF possesses great therapeutic value in several pathologies such as Parkinson’s disease or Amyotrophic lateral sclerosis among others diseases where it is used in molecular and cellular treatments still on trial. Besides, novel modifications to GDNF peptide have been engineered to improve bio-distribution, half-life and lower immunogenicity [111]; the understanding of the whole range of properties of this and maybe other trophic molecules could allow us to open wide the action range of these factors in order to accelerate and/or improve those therapies.

REFERENCES

1. Lin LF, Doherty DH, Lile JD et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**. 1993;260:1130-1132.
2. Moore MW, Klein RD, Farinas I et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. **Nature**. 1996;382:76-79.
3. Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J et al. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. **Nature**. 1996;382:70-73.
4. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. **Nature**. 1996;382:73-76.
5. Tolbert DL, Bradley MW, Tolod EG et al. Chronic intraventricular infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) rescues some cerebellar Purkinje cells from hereditary degeneration. **Experimental neurology**. 2001;170:375-379.
6. Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K. GDNF prevents TGF-beta-induced damage of the plasma membrane in cerebellar granule neurons by suppressing activation of p38-MAPK via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Cell and tissue research**. 2008;331:373-383.
7. Martin D, Miller G, Rosendahl M et al. Potent inhibitory effects of glial derived neurotrophic factor against kainic acid mediated seizures in the rat. **Brain research**. 1995;683:172-178.
8. Miyazaki H, Okuma Y, Fujii Y et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in rats. **Neuroscience**. 1999;89:643-647.
9. Trupp M, Ryden M, Jornvall H et al. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. **The Journal of cell biology**. 1995;130:137-148.
10. Konishi Y, Yang LB, He P et al. Deficiency of GDNF Receptor GFRalpha1 in Alzheimer's Neurons Results in Neuronal Death. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2014;34:13127-13138.
11. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. **Science**. 1994;266:1062-1064.
12. Ibanez CF, Andressoo JO. Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system. **Neurobiology of disease**. 2016.
13. Li L, Cao J, Zhang S et al. NCAM signaling mediates the effects of GDNF on chronic morphine-induced neuroadaptations. **Journal of molecular neuroscience : MN**. 2014;53:580-589.
14. Choi-Lundberg DL, Bohn MC. Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. **Brain research Developmental brain research**. 1995;85:80-88.
15. Springer JE, Mu X, Bergmann LW et al. Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. **Experimental neurology**. 1994;127:167-170.
16. Saavedra A, Baltazar G, Duarte EP. Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights. **Progress in neurobiology**. 2008;86:186-215.

17. Kawamoto Y, Nakamura S, Matsuo A et al. Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human central nervous system. **Neuroscience**. 2000;100:701-712.
18. Quartu M, Serra MP, Boi M et al. Tissue distribution of Ret, GFRalpha-1, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 receptors in the human brainstem at fetal, neonatal and adult age. **Brain research**. 2007;1173:36-52.
19. Hellmich HL, Kos L, Cho ES et al. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. **Mechanisms of development**. 1996;54:95-105.
20. Greene D, Copp AJ. Neural tube defects. **Annual Review Neuroscience**. 2015 37:22.
21. Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. **Journal of cell science**. 2003;116:3855-3862.
22. Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M et al. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. **Journal of pediatric surgery**. 2000;35:1017-1025.
23. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. **Nature**. 1996;382:80-83.
24. Paratcha G, Ledda F. GDNF and GFR alpha: a versatile molecular complex for developing neurons. **Trends in neurosciences**. 2008;31:384-391.
25. Yu T, Scully S, Yu Y et al. Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 1998;18:4684-4696.
26. Ikeda T, Xia XY, Xia YX et al. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the brain and cerebrospinal fluid of the developing rat. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**. 1999;17:681-691.
27. Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. Motor neuron diversity in development and disease. **Annual review of neuroscience**. 2010;33:409-440.
28. Hoyng SA, De Winter F, Gnani S et al. A comparative morphological, electrophysiological and functional analysis of axon regeneration through peripheral nerve autografts genetically modified to overexpress BDNF, CNTF, GDNF, NGF, NT3 or VEGF. **Experimental neurology**. 2014;261:578-593.
29. Tannemaat MR, Eggers R, Hendriks WT et al. Differential effects of lentiviral vector-mediated overexpression of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on regenerating sensory and motor axons in the transected peripheral nerve. **The European journal of neuroscience**. 2008;28:1467-1479.
30. Pahnke J, Mix E, Knoblich R et al. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor induces genes regulating migration and differentiation of neuronal progenitor cells. **Experimental cell research**. 2004;297:484-494.
31. Santos D, Giudetti G, Micera S et al. Focal release of neurotrophic factors by biodegradable microspheres enhance motor and sensory axonal regeneration in vitro and in vivo. **Brain research**. 2016;1636:93-106.
32. Qin J, Wang L, Sun Y et al. Concentrated growth factor increases Schwann cell proliferation and neurotrophic factor secretion and promotes functional nerve recovery in vivo. **International journal of molecular medicine**. 2016;37:493-500.

33. Marquardt LM, Ee X, Iyer N et al. Finely Tuned Temporal and Spatial Delivery of GDNF Promotes Enhanced Nerve Regeneration in a Long Nerve Defect Model. **Tissue engineering Part A**. 2015;21:2852-2864.
34. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. **Neurosurgical focus**. 2009;26:E3.
35. Forostyak S, Jendelova P, Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications. **Biochimie**. 2013;95:2257-2270.
36. Awad BI, Carmody MA, Steinmetz MP. Potential role of growth factors in the management of spinal cord injury. **World neurosurgery**. 2015;83:120-131.
37. Merlio JP, Ernfors P, Jaber M et al. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. **Neuroscience**. 1992;51:513-532.
38. Hyman C, Juhasz M, Jackson C et al. Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 1994;14:335-347.
39. Engele J, Schilling K. Growth factor-induced c-fos expression defines distinct subsets of midbrain dopaminergic neurons. **Neuroscience**. 1996;73:397-406.
40. Lei Z, Jiang Y, Li T et al. Signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor GFRalpha1 induce Nurr1 and Pitx3 to promote survival of grafted midbrain-derived neural stem cells in a rat model of Parkinson disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**. 2011;70:736-747.
41. Ling ZD, Potter ED, Lipton JW et al. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. **Experimental neurology**. 1998;149:411-423.
42. Roussa E, Kriegstein K. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres. **Neuroscience letters**. 2004;361:52-55.
43. Peng C, Aron L, Klein R et al. Pitx3 is a critical mediator of GDNF-induced BDNF expression in nigrostriatal dopaminergic neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2011;31:12802-12815.
44. Zhu SY, Zhao CJ, Wu YY et al. Identification of a Vav2-dependent mechanism for GDNF/Ret control of mesolimbic DAT trafficking. **Nature neuroscience**. 2015;18:1084-+.
45. Schaller B, Andres RH, Huber AW et al. Effect of GDNF on differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic and non-dopaminergic calretinin-expressing neurons. **Brain research**. 2005;1036:163-172.
46. Feng L, Wang CY, Jiang H et al. Differential effects of GDNF and BDNF on cultured ventral mesencephalic neurons. **Brain research Molecular brain research**. 1999;66:62-70.
47. Yang F, Feng L, Zheng F et al. GDNF acutely modulates excitability and A-type K(+) channels in midbrain dopaminergic neurons. **Nature neuroscience**. 2001;4:1071-1078.
48. Consales C, Volpicelli F, Greco D et al. GDNF signaling in embryonic midbrain neurons in vitro. **Brain research**. 2007;1159:28-39.
49. Christophersen NS, Gronborg M, Petersen TN et al. Midbrain expression of Delta-like 1 homologue is regulated by GDNF and is associated with dopaminergic differentiation. **Experimental neurology**. 2007;204:791-801.
50. Hebert MA, Van Horne CG, Hoffer BJ et al. Functional effects of GDNF in normal rat striatum: presynaptic studies using in vivo electrochemistry and microdialysis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 1996;279:1181-1190.

51. Pothos EN, Davila V, Sulzer D. Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 1998;18:4106-4118.
52. Bourque MJ, Trudeau LE. GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. **The European journal of neuroscience**. 2000;12:3172-3180.
53. Rolletschek A, Chang H, Guan K et al. Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. **Mechanisms of development**. 2001;105:93-104.
54. Buytaert-Hoefen KA, Alvarez E, Freed CR. Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. **Stem cells**. 2004;22:669-674.
55. Yue F, Cui L, Johkura K et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from primate embryonic stem cells by coculture with sertoli cells. **Stem Cells**. 2006;24:1695-1706.
56. Ostenfeld T, Tai YT, Martin P et al. Neurospheres modified to produce glial cell line-derived neurotrophic factor increase the survival of transplanted dopamine neurons. **Journal of neuroscience research**. 2002;69:955-965.
57. Young A, Assey KS, Sturkie CD et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances in vitro differentiation of mid-/hindbrain neural progenitor cells to dopaminergic-like neurons. **Journal of neuroscience research**. 2010;88:3222-3232.
58. Zurn AD, Winkel L, Menoud A et al. Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro. **Journal of neuroscience research**. 1996;44:133-141.
59. Nguyen QT, Parsadanian AS, Snider WD et al. Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. **Science**. 1998;279:1725-1729.
60. Ribchester RR, Thomson D, Haddow LJ et al. Enhancement of spontaneous transmitter release at neonatal mouse neuromuscular junctions by the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). **The Journal of physiology**. 1998;512 (Pt 3):635-641.
61. Keller-Peck CR, Feng G, Sanes JR et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2001;21:6136-6146.
62. Buss RR, Gould TW, Ma J et al. Neuromuscular development in the absence of programmed cell death: phenotypic alteration of motoneurons and muscle. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2006;26:13413-13427.
63. Gould TW, Yonemura S, Oppenheim RW et al. The neurotrophic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on spinal motoneurons are restricted to fusimotor subtypes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2008;28:2131-2146.
64. Shneider NA, Brown MN, Smith CA et al. Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. **Neural development**. 2009;4:42.
65. Cortes D, Robledo-Arratia Y, Hernandez-Martinez R et al. Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation, Differentiation, Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells. **Frontiers in cellular neuroscience**. 2016;10:217.
66. Lee SK, Lee B, Ruiz EC et al. Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. **Genes & development**. 2005;19:282-294.
67. Ortega-de San Luis C, Pascual A. Simultaneous Detection of Both GDNF and GFRalpha1 Expression Patterns in the Mouse Central Nervous System. **Front Neuroanat**. 2016;10:73.

68. Shimada T, Yaginuma H, Sato N et al. Neurogenin2 expression together with NeuroM regulates GDNF family neurotrophic factor receptor alpha1 (GFRalpha1) expression in the embryonic spinal cord. **Developmental biology**. 2012;370:250-263.
69. Zhuang H, Bu S, Hua L et al. Gelatin-methacrylamide gel loaded with microspheres to deliver GDNF in bilayer collagen conduit promoting sciatic nerve growth. **International journal of nanomedicine**. 2016;11:1383-1394.
70. Wang B, Yuan J, Chen X et al. Functional regeneration of the transected recurrent laryngeal nerve using a collagen scaffold loaded with laminin and laminin-binding BDNF and GDNF. **Scientific reports**. 2016;6:32292.
71. Hernandez-Morato I, Tewari I, Sharma S et al. Blockade of glial-derived neurotrophic factor in laryngeal muscles promotes appropriate reinnervation. **The Laryngoscope**. 2016;126:E337-342.
72. Zahavi EE, Ionescu A, Gluska S et al. A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. **Journal of cell science**. 2015;128:1241-1252.
73. Yang LX, Nelson PG. Glia cell line-derived neurotrophic factor regulates the distribution of acetylcholine receptors in mouse primary skeletal muscle cells. **Neuroscience**. 2004;128:497-509.
74. Huang S, Wang F, Hong G et al. Protective effects of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. **Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban**. 2002;22:148-151.
75. Wang CY, Yang F, He XP et al. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. **The Journal of biological chemistry**. 2002;277:10614-10625.
76. Willand MP, Rosa E, Michalski B et al. Electrical muscle stimulation elevates intramuscular BDNF and GDNF mRNA following peripheral nerve injury and repair in rats. **Neuroscience**. 2016;334:93-104.
77. Stanga S, Zanou N, Audouard E et al. APP-dependent glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression drives neuromuscular junction formation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2016;30:1696-1711.
78. Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J et al. Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo. **Developmental biology**. 1998;204:385-406.
79. Bordeaux MC, Forcet C, Granger L et al. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. **The EMBO journal**. 2000;19:4056-4063.
80. Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J et al. Neurotrophin-3 induces neural crest-derived cells from fetal rat gut to develop in vitro as neurons or glia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 1994;14:6571-6584.
81. Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P et al. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. **Development**. 1999;126:2785-2797.
82. Forander P, Broberger C, Stromberg I. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor induces nerve fibre formation in primary cultures of adrenal chromaffin cells. **Cell and tissue research**. 2001;305:43-51.

83. Kohno S, Murata T, Koide N et al. Establishment and characterization of a noradrenergic adrenal chromaffin cell line, tsAM5NE, immortalized with the temperature-sensitive SV40 T-antigen. **Cell biology international**. 2011;35:325-334.
84. Couplier M, Anders J, Ibanez CF. Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. **The Journal of biological chemistry**. 2002;277:1991-1999.
85. Thang SH, Kobayashi M, Matsuoka I. Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor responsiveness in developing rat sympathetic neurons by retinoic acid and bone morphogenetic protein-2. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2000;20:2917-2925.
86. Doxakis E, Davies AM. Retinoic acid negatively regulates GDNF and neurturin receptor expression and responsiveness in embryonic chicken sympathetic neurons. **Molecular and cellular neurosciences**. 2005;29:617-627.
87. Cummins TR, Black JA, Dib-Hajj SD et al. Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2000;20:8754-8761.
88. Peterson S, Bogenmann E. The RET and TRKA pathways collaborate to regulate neuroblastoma differentiation. **Oncogene**. 2004;23:213-225.
89. Baldassarre G, Bruni P, Boccia A et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces proliferative inhibition of NT2/D1 cells through RET-mediated up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). **Oncogene**. 2002;21:1739-1749.
90. Qu DW, Liu Y, Wang L et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes proliferation of neuroglioma cells by up-regulation of cyclins PCNA and Ki-67. **European review for medical and pharmacological sciences**. 2015;19:2070-2075.
91. Bilgic A, Toker A, Isik U et al. Serum brain-derived neurotrophic factor, glial-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **European child & adolescent psychiatry**. 2016.
92. Shim SH, Hwangbo Y, Yoon HJ et al. Increased levels of plasma glial-derived neurotrophic factor in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Nord J Psychiat**. 2015;69:546-551.
93. Sharma AN, da Costa e Silva BF, Soares JC et al. Role of trophic factors GDNF, IGF-1 and VEGF in major depressive disorder: A comprehensive review of human studies. **Journal of affective disorders**. 2016;197:9-20.
94. Lin PY, Tseng PT. Decreased glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with depression: A meta-analytic study. **J Psychiatr Res**. 2015;63:20-27.
95. Maheu M, Lopez JP, Crapper L et al. MicroRNA regulation of central glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) signalling in depression. **Transl Psychiat**. 2015;5.
96. Merighi A. Targeting the glial-derived neurotrophic factor and related molecules for controlling normal and pathologic pain. **Expert opinion on therapeutic targets**. 2016;20:193-208.
97. Salio C, Ferrini F, Muthuraju S et al. Presynaptic modulation of spinal nociceptive transmission by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. 2014;34:13819-13833.
98. Salio C, Ferrini F. BDNF and GDNF expression in discrete populations of nociceptors. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**. 2016;207:55-61.

99. Kimura M, Sakai A, Sakamoto A et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-mediated enhancement of noradrenergic descending inhibition in the locus coeruleus exerts prolonged analgesia in neuropathic pain. **Brit J Pharmacol**. 2015;172:2469-2478.
100. Cheung K, Hume PA, Maxwell L. Delayed onset muscle soreness - Treatment strategies and performance factors. **Sports Med**. 2003;33:145-164.
101. Mizumura K, Taguchi T. Delayed onset muscle soreness: Involvement of neurotrophic factors. **J Physiol Sci**. 2016;66:43-52.
102. Forrest SL, Payne SC, Keast JP et al. Peripheral injury of pelvic visceral sensory nerves alters GFR alpha (GDNF family receptor alpha) localization in sensory and autonomic pathways of the sacral spinal cord. **Front Neuroanat**. 2015;9.
103. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. **Nature**. 2010;463:1035-1041.
104. Li X, Zuo X, Jing J et al. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. **Cell stem cell**. 2015;17:195-203.
105. Zhu TQ, Yu DH, Feng JX et al. GDNF and NT-3 Induce Progenitor Bone Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Neurons in Fetal Gut Culture Medium. **Cellular and molecular neurobiology**. 2015;35:255-264.
106. Storch A, Paul G, Csete M et al. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. **Experimental neurology**. 2001;170:317-325.
107. Riaz SS, Theofilopoulos S, Jauniaux E et al. The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. **Brain research Developmental brain research**. 2004;153:39-51.
108. Sun ZH, Lai YL, Li P et al. GDNF augments survival and differentiation of TH-positive neurons in neural progenitor cells. **Cell biology international**. 2004;28:323-325.
109. Zihlmann KB, Ducray AD, Schaller B et al. The GDNF family members neurturin, artemin and persephin promote the morphological differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons. **Brain research bulletin**. 2005;68:42-53.
110. Wood TK, McDermott KW, Sullivan AM. Differential effects of growth/differentiation factor 5 and glial cell line-derived neurotrophic factor on dopaminergic neurons and astroglia in cultures of embryonic rat midbrain. **Journal of neuroscience research**. 2005;80:759-766.
111. Smith RC, O'Bryan LM, Mitchell PJ et al. Increased brain bio-distribution and chemical stability and decreased immunogenicity of an engineered variant of GDNF. **Experimental neurology**. 2015;267:165-176.

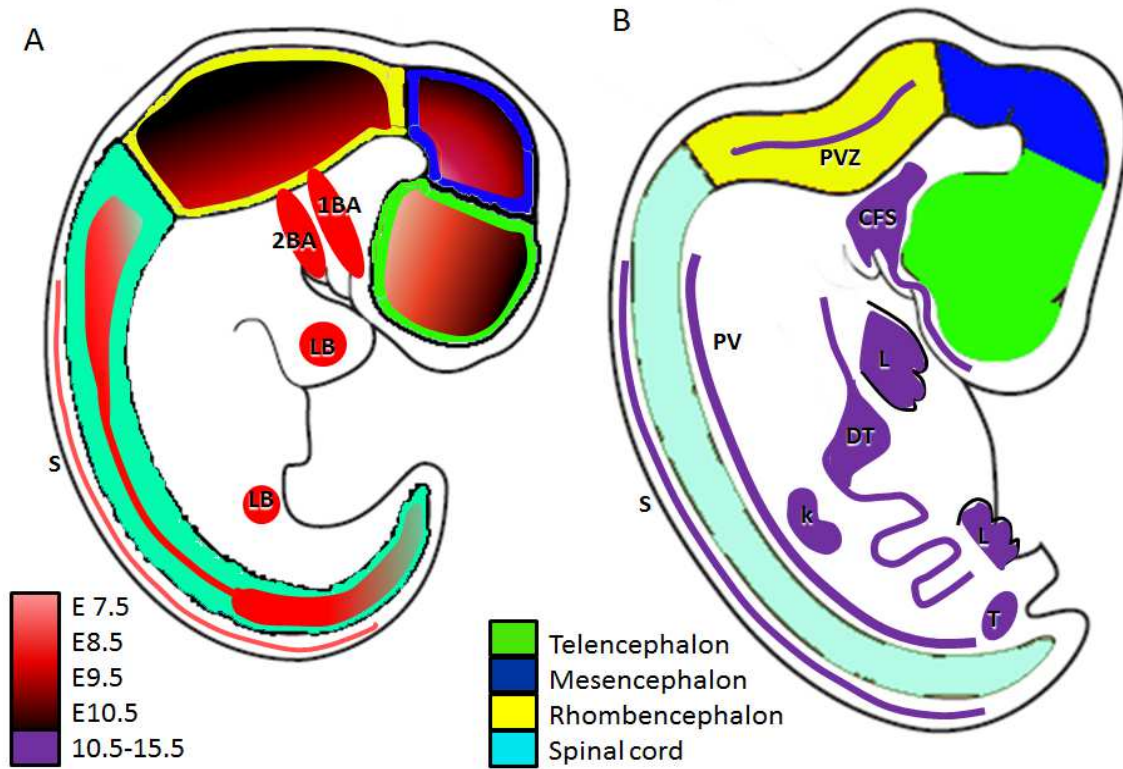


Fig. 1. GDNF expression during embryonic development. A) Schematic representation of stages E7.5-10.5, GDNF expression appears first in ventral forebrain and extends thru caudal and dorsally according to the color code in red; which indicates the first time of appearance in that region. B) Scheme that represent the expression of GDNF (purple) along E10.5-15.5. Contrary to early stages at this time, expression is mostly extraneural. 1BA: first branchial arch, 2BA: second branchial arch. LB: limb bud, S: dorsolateral portion of somites, PVZ: periventricular zone, CFS: craniofacial structures, L: limb, DT: digestive tube, PV: paravertebral mesenchyme, K: kidney, T: testis

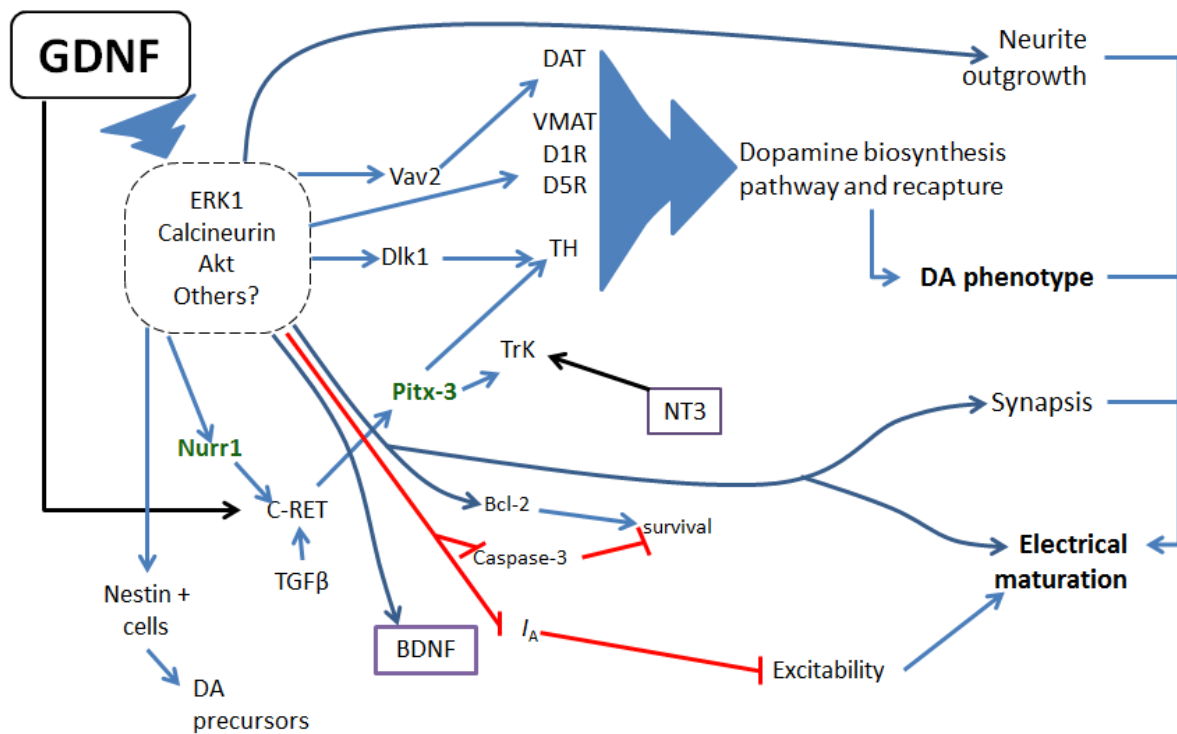


Fig. 2. GDNF and its molecular interactions. GDNF regulate several protein and transcription factors via ERK, Calcineurin, AKT, pathway (dotted square); some of these actions have been related directly to at least one of these transducing pathways but not all of them have been dilucidated. Utterly what GDNF promotes is electrical and synaptic maturation, survival and the acquisition of a DA phenotype. Blue arrows denote positive interaction, red ones negative interaction and black arrows positive interaction by binding of the ligand to its receptor. Purple boxes denote soluble factors. Green letters are transcriptional factors that maintain the DA phenotype thru whole animal life. I_A , A-type potassium channel

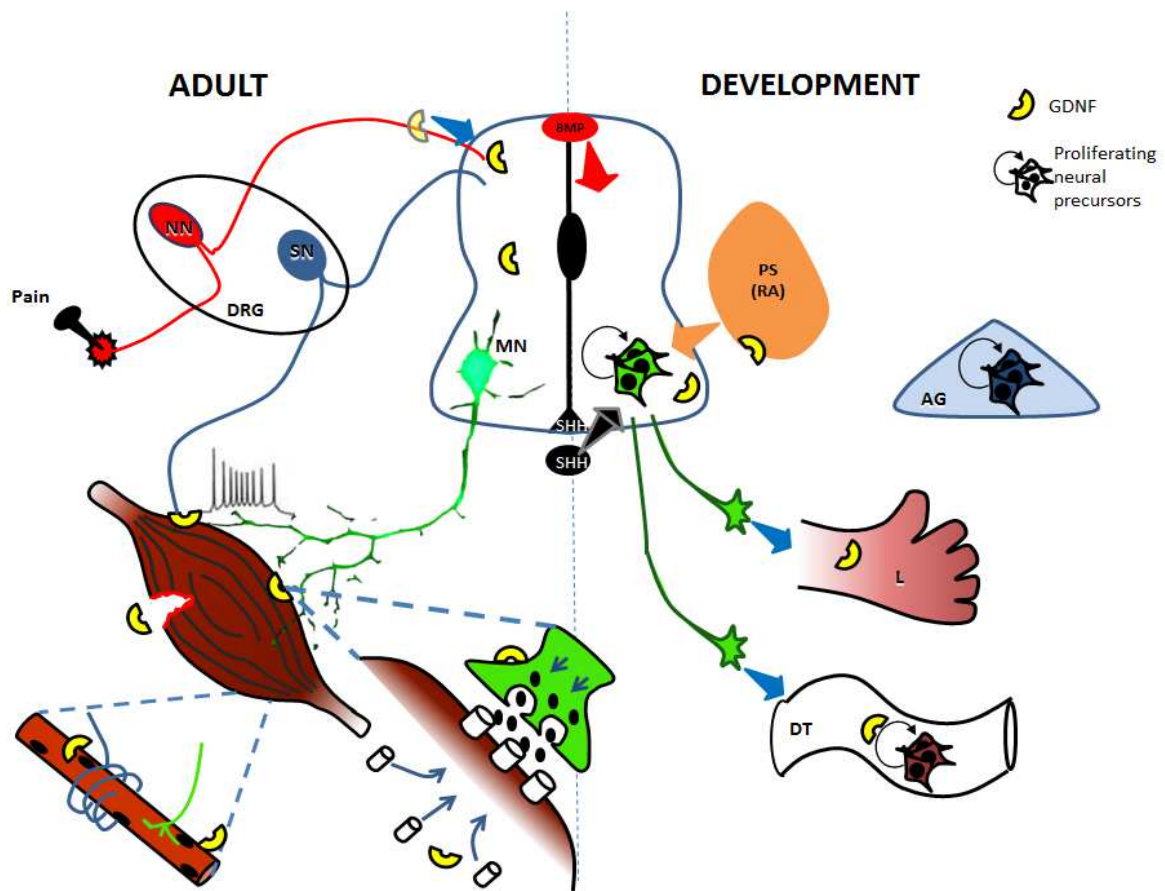


Fig. 3. GDNF possesses diverse roles in spinal cord (Adult, left side) and neural tube (development, right side) and their associated tissues. During development, the neural tube secretes SHH from the notocord and floor plate to induce the ventralization of neural tube; RA induces caudalization. During early stages, GDNF is able to induce the proliferation of neural precursors to increase the pool of these cells in ventral neural tube, digestive tube and adrenal gland. In later stages GDNF seems to protract MN axons to limb bud, specific group of muscles, or ENS, etc. In adult organisms, GDNF is produced by Clarke cells in central SC and interneurons; besides, in MNs facilitates the release of Ach. In muscle, GDNF promotes the translocation of AchR, the innervation of SN, and the connection between alpha MNs and intrafusal muscle fibers. GDNF also collaborates in muscular recovery after MOPS and injury. Finally GDNF is secreted by peptidergic neurons in the DRG to modulate threshold pain. DRG, dorsal root ganglion; NN, nociceptive pain; SN, sensory neuron; BMP, bone morphogenetic protein; SHH, sonic hedgehog; MN, motor neuron; PS, paraxial somite; RA, retinoic acid; AG, adrenal gland; L, limb; DT, digestive tube.