



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Direccionamiento de axones de neuronas dopaminérgicas humanas por Semaforina 3C
en cultivos organotípicos de cerebro**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Beetsi Eugenia Urrieta Chávez

Comité tutor:

Dr. Iván Velasco Velázquez

Instituto de Fisiología Celular

Dr. José Bargas Díaz

Instituto de Fisiología celular

Dra. Leonor Pérez Martínez

Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

Esta tesis se realizó en el laboratorio AL-101 de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, en colaboración con el Laboratorio de Reprogramación Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Itzel Escobedo Ávila, así como de la Unidad de Imagenología. Agradezco igualmente al personal del bioterio. Agradezco también al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por su apoyo para mi asistencia a congresos. Durante los estudios, recibí una beca de posgrado otorgado por el CONACYT. Los experimentos se realizaron con el apoyo de los donativos IN213719 de PAPIIT, DGAPA, UNAM y 272815 de CONACYT.

Agradecimientos personales

Agradezco el apoyo y dirección de mi tutor Iván Velasco, así como el apoyo intelectual del Dr. José Bargas y su equipo. También agradezco a mis compañeros del laboratorio AL-101 por su amistad y consejos; a mis amigas por su apoyo incondicional, a mi novio por su enorme cariño, y finalmente a mi familia, sin la cual no sería lo que soy.

Índice

Agradecimientos institucionales	1
Agradecimientos personales	1
Índice	2
Abreviaturas	4
Abstract	5
1- Resumen	5
2- Introducción	6
2.1- Los ganglios basales	6
2.2- Cerebro medio y formación de neuronas dopaminérgicas	7
2.3- Enfermedad de Parkinson	9
2.4- Características de la enfermedad de Parkinson	10
2.5- Tratamientos para la enfermedad de Parkinson	12
2.6- Modelos para el estudio de la enfermedad de Parkinson	13
2.7- Semaforinas, guías para el crecimiento axonal de neuronas dopaminérgicas	17
2.8- Hidrogeles como método de liberación de Sema3C	19
Antecedentes	20
3.1- Hipótesis	21
3.2- Objetivo general	21
4- Métodos	22
4.1- Diferenciación y maduración de neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias humanas	22
4.2- Cultivo organotípico de la vía nigro-estriatal.	23
4.3- Inmunofluorescencia para rebanadas de cultivo organotípico	24
4.4 Inmunofluorescencia para cultivos de NDa	25
4.5- Pruebas de liberación de dopamina	25
4.5a HPLC	25
4.5b Amperometría	25
4.6- Ensayos de viabilidad	26
4.6a Incubación con calceína-AM	26
4.6b Imagenología de calcio	26
4.6c Ensayo de TUNEL	29
4.7- Trasplante de Neuronas Dopaminérgicas Maduras	29
4.8- Registros electrofisiológicos	29

4.9- Ensayo de crecimiento axonal	30
Resumen de métodos	31
5- Resultados	31
1.1- Diferenciación de células troncales embrionarias H9 GFP a neuronas dopaminérgicas	31
1.2- Caracterización de neuronas dopaminérgicas	32
1.2a Inmunofluorescencia para neuronas de 50 días de maduración	32
1.2b Caracterización electrofisiológica por <i>patch clamp</i>	33
1.2c Ensayo de liberación de dopamina por HPLC	35
1.2d Medición de liberación catecolaminérgica por amperometría	36
1.3- Ensayo de crecimiento axonal de neuronas maduras	38
2.0- Cultivo organotípico como modelo de enfermedad de Parkinson	39
2.1- Ensayos de viabilidad y muerte celular en cultivo organotípico	40
3.0- Trasplante de NDa maduras sobre el tejido parkinsoniano de cultivo organotípico	42
3.1 Registro electrofisiológico de células trasplantadas	42
3.2- Análisis de microcircuitos neuronales en el estriado de cultivos organotípicos	43
6- Discusión	47
1) Maduración <i>in vitro</i> de NDa previamente diferenciadas a partir de hESCs	48
2) Cultivo organotípico como modelo de la enfermedad de Parkinson	51
3) Trasplante de NDa sobre la SN de cultivo organotípico	54
7- Conclusiones	57
8- Perspectivas	57
9- Referencias	58

Abreviaturas

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

BMPs: Bone morphogenic proteins - Proteínas morfogénicas del hueso

Da: Dopamina

DAT: Transportador de dopamina

DOPAC: Ácido dihidroxifenilacético

ESCs: Células troncales embrionarias

hESCs: Células troncales embrionarias humanas

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía

GFP: Green fluorescent protein - Proteína verde fluorescente

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

iPSC: Células pluripotentes inducidas

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina

NDa: Neuronas dopaminérgicas

NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico

PD: Parkinson disease

Sema3C: Semaforina 3C

SN: *substantia nigra*

SNpc: *substantianigra pars compacta*

SPN: Spiny projection neurons - neuronas espinosas medianas

TH: Tirosina hidroxilasa

Tuj1: Beta-tubulina III

VTA: Área tegmental ventral

α S: α -Sinucleína

Abstract

Some neurological diseases are characterized by the loss of specific neuronal populations, leading to the disruption of neuronal circuitry. In Parkinson Disease patients, motor symptoms are caused by the death of dopaminergic neurons (DaN) of *substantia nigra* (SN) *pars compacta*, which leads to the loss of the nigrostriatal pathway and an imbalance of striatal microcircuits. It has been previously proved that DaN differentiated from mouse embryonic stem cells, grafted in the SN may restore motor symptoms *in vivo*. In that work, a guidance cue (Semaphorin 3C) expressed by HEK cells was employed to direct dopaminergic axons towards the striatum. However, Sema3C may also be released by a hydrogel to stimulate and direct the axonal growth of rodent and human DaN. In this work, we used an organotypic culture model to study the effect of DaN grafted in the SN under the effect of Sema3C released by the hydrogel from the striatum. The results showed that grafted cells are able to integrate into the tissue and respond to a chemotropic stimulus to reach the striatal area. We showed that grafted neurons preserve their electrophysiological properties in the organotypic slice. Further, human DaN partially restore the patterns of activity that were affected by the lack of dopamine in microcircuits present in the striatum, in this model.

1- Resumen

Algunas enfermedades neurodegenerativas están caracterizadas por la muerte de cierta población neuronal, lo que tiene como consecuencia la pérdida de circuitos neuronales. En pacientes con la enfermedad de Parkinson (PD) los síntomas motrices están causados por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (NDa) de la *substantia nigra* (SN) *pars compacta* (SNpc). Dicha muerte conlleva a la pérdida de la vía nigro-estriatal y posteriormente a desbalances en los circuitos estriatales. Previamente se encontró que el trasplante de NDa, diferenciadas de células troncales embrionarias (ESCs), en la SN de ratas parkinsonianas, tiene como efecto la recuperación conductual al emplear un atractor y promotor del crecimiento axonal, la Semaforina 3C (Sema3C), que fue liberada por células HEK transfectadas y trasplantadas en el trayecto de la SN al estriado. Sin embargo, la Sema3C también puede ser liberada desde un hidrogel biocompatible para promover el crecimiento y guiar a los axones de NDa, tanto con células de roedores como de células humanas. En el presente trabajo se utilizó un modelo de cultivo organotípico, carente de NDa endógenas, para estudiar el efecto del trasplante de NDa humanas, sembradas en la SN de la rebanada, en combinación con la Sema3C liberada por el hidrogel, aplicado en dirección al estriado. Los resultados mostraron la capacidad de las NDa para integrarse en el tejido y responder al estímulo quimiotrópico. Encontramos que las neuronas trasplantadas mantienen sus

propiedades electrofisiológicas en el cultivo organotípico. Adicionalmente, las alteraciones en los circuitos estriatales causados por la falta de dopamina, detectados mediante la imagenología de calcio intracelular, disminuyeron con los trasplantes.

2- Introducción

El título del presente trabajo involucra temas tanto de enfermedades neurodegenerativas como de crecimiento axonal. En este contexto, la pérdida de cierta población neuronal es responsable de la aparición de síntomas, que por lo general se detectan en etapas avanzadas de la enfermedad. Por ésto, y como tratamiento propuesto por la medicina regenerativa, se ha desarrollado el estudio en el uso de trasplantes celulares -en particular, provenientes de células diferenciadas de células troncales embrionarias- como reemplazo de la población neuronal faltante. Para que dicho trasplante sea exitoso, es necesaria la incorporación, integración y supervivencia de las neuronas en el tejido hospedero. En esta tesis se utilizó un modelo de rebanadas cerebrales de rata que carecen de NDa, en el cual se pretende utilizar la terapia de reemplazo celular como posible tratamiento. Por ello, es importante iniciar la introducción con las características de los tejidos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad: los ganglios basales, la *substantia nigra* (SN) y la vía nigro-estriatal.

2.1- Los ganglios basales

Los ganglios basales están formados por un conjunto de núcleos anatómicamente distintos, pero relacionados mediante circuitos, que regulan el control de acciones y de movimientos voluntarios (Poewe *et al.*, 2017). En particular, el cuerpo estriado, compuesto por los núcleos caudado, putamen y accumbens, es uno de los mayores centros de integración de señales relacionadas a dos tipos de movimiento: aquellos relacionados con los hábitos (bajo el control del estriado dorso-lateral) y aquellos relacionados con movimientos voluntarios (bajo el control del estriado dorso-medial) (Tanimura *et al.*, 2017). El estriado está compuesto en un 90% por neuronas espinosas medianas (SPN de *spiny projection neurons*) y 5-10% de interneuronas (Zhai *et al.*, 2018), que reciben señales glutamatérgicas excitatorias desde la corteza y el tálamo, e inervación dopaminérgica desde la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Gerfen & Surmeier, 2011). Según los receptores dopaminérgicos que expresen, se divide a las SPN en dos grupos principales: aquellos que presentan el receptor D1, conforman la vía directa y proyectan sus axones hacia el segmento interno del globo pálido y la *substantia nigra pars reticulata*; y aquellas que

presentan el receptor D2, que conforman la vía indirecta y proyectan hacia el segmento externo del globo pálido (Ver figura 1) (Zhai *et al.*, 2018).

Como veremos más adelante, en pacientes con enfermedad de Parkinson (PD) estos circuitos se ven alterados. Sin embargo, antes de entrar de lleno en la descripción de la enfermedad, es importante describir algunas de las características de las neuronas dopaminérgicas (NDa), población neuronal blanco en esta enfermedad, y su diferenciación.

2.2- Cerebro medio y formación de neuronas dopaminérgicas

Las NDa son un tipo de neuronas que sintetizan y liberan dopamina (Da), neurotransmisor catecolaminérgico. Se encuentran, entre otras, en la región ventral del cerebro medio de los mamíferos (Arenas, Denham & Viellaescusa 2015). Tras la formación de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) durante la gastrulación, se forma el neuroectodermo por la señal de ciertos inhibidores (inhibidores de vías como Wnt, Nodal, y de las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs)), lo cual determina la formación del tubo neural (Revisado en Takaoka, Yamamoto & Hamada, 2007). Desde la formación del tubo se produce una regionalización antero-posterior y dorso-ventral. Dicha separación es reafirmada por la expresión diferencial de factores de transcripción como *Otx2* en el futuro cerebro anterior y medio, y *Gbx2* en el futuro cerebro posterior. La expresión coordinada y represión mutua de estos factores dará lugar a la formación del límite entre cerebro medio y posterior (MHB, midbrain-hindbrain boundary). En esta región se formará el primero de los dos centros organizadores esenciales para la especificación del mesencéfalo gracias a la expresión regulada de los morfógenos *Wnt1* en el cerebro medio y *Fgf8* en el posterior: el IsO (organizador ístmico).

El segundo centro señalizador, que permite la ventralización del tubo, es la placa del piso y se especifica por la señalización de SHH (sonic hedgehog) en un inicio proveniente de la notocorda y más adelante expresado por el mismo y por la expresión de *Foxa2*. En esta región, por el gradiente de SHH que se crea y el conjunto de señales como factores de transcripción y morfógenos liberados por ambos centros organizadores se consolida una identidad molecular que potenciará la formación de los progenitores de las NDa, en la zona ventricular del plato ventral del mesencéfalo (Gale & Li, 2008; Hegarty, Sullivan & O'Keefe, 2013). Éstas posteriormente madurarán con la ayuda de algunos factores esenciales para su desarrollo y supervivencia como *Lmx1 α* , *Lmx1 β* , *Pitx3*, *Girk2*, *Nurr1*, *En1*, y migrarán hacia la zona intermedia hasta la zona del manto (Fu *et al.*, 2016; Arenas, Denham & Viellaescusa 2015). Mientras que la especificación del mesencéfalo comienza alrededor del día E7 en ratas, la diferenciación de las NDa se llevará a cabo alrededor del día 12.5, tiempo en el cual comienzan a dirigir sus proyecciones hacia la región dorsal. Seguido a esto, a lo largo del día

13.5 los axones dan un giro hacia la parte rostral del diencefalo, al cual llegan al día 14.5. Finalmente, a lo largo del día E15 llegan e invaden el estriado en formación (Hernández-Montiel *et al.*, 2008). Esta conexión es el resultado de un direccionamiento ocasionado por una serie de señales que ejercen efectos quimiotrópicos sobre los axones de las NDa. En particular están involucradas las Semaforinas, que se discuten más adelante.

Las NDa se distinguen de otros tipos neuronales principalmente por sus características electrofisiológicas. En estudios *in vivo* e *in vitro* se observan diferencias debido a la falta de regulación proveniente de los núcleos que en un organismo completo regulan la actividad de las NDa de la SNpc. No obstante, lo que distingue a este tipo celular es un potencial de acción amplio, una respuesta de rectificación característica llamada *sag* (dada por pulsos hiperpolarizantes con una respuesta tiempo dependiente), una mayor adaptación a la corriente (y por lo tanto menor frecuencia de disparo), y patrones de disparo diferentes, ya sea regulares, irregulares o en *burst* (Rohrbracher, Ichinohe & Kitai, 2000).

Las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio se subdividen en tres tipos, las A8, del área retrorubral, las A10 en el área tegmental ventral (VTA) y las A9, de la SNpc. Sin embargo, estas son diferentes a nivel morfológico y funcional: las NDa A9 presentan procesos muy largos no mielinizados y muy ramificados, cada uno de los cuales puede inervar hasta el 6% del estriado, con una gran cantidad de sitios de liberación de neurotransmisor, lo cual implica una carga metabólica mayor que las hace más susceptibles en comparación a, por ejemplo, las A10 (López *et al.*, 2016; Matsuda *et al.*, 2009; Surmeier *et al.*, 2017). Esto podría explicar parcialmente la selectividad en cuanto a las zonas que se ven afectadas durante la PD, que concierne principalmente a las NDa A9. Además, estas poblaciones se diferencian según el núcleo al cual pertenecen, pero también por la región que inervan: las A8 y A10 proyectan hacia el estriado dorsomedial (núcleo acumbens), formando parte del sistema mesolímbico y mesocortical, mientras que las A9 de la SNpc proyectan sus axones hacia el estriado dorsolateral (caudado-putamen), formando así la vía nigro-estriatal, regulando las funciones motrices (Arenas, Denham & Viellaescusa 2015). En la Figura 1 se esquematiza la distribución de los diferentes tipos de NDa y sus sitios de proyección. En particular podemos ver en rosa la proyección de las A9 que forma la vía nigro-estriatal.

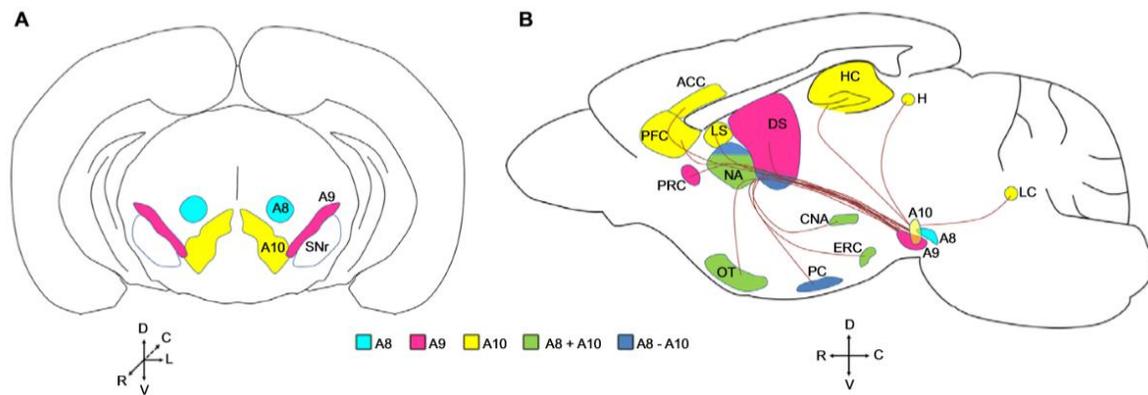


Figura 1. Distribución de los subtipos de NDa y sus proyecciones en cerebro de ratón. A8, retrorubral; A9, substantia nigra pars compacta; A10, área tegmental ventral; A8+A10, estructuras innervadas por A8 y A10; A8-A10, estructuras innervadas por NDa A8, A9 y A10. ACC corteza cingulada anterior; CNA, núcleo central de la amígdala; DS, estriado dorsal; ERC corteza entorrinal; H, habénula; HC, hipocampo; LC, locus coeruleus; LS septum lateral; NA, núcleo accumbens; OT, tubérculo olfatorio; PFC, corteza prefrontal; PRC, corteza perirrinal; PC corteza piriforme. Tomada de Arenas, Denham y Villaescusa, 2015.

2.3- Enfermedad de Parkinson

La PD es una enfermedad progresiva y crónico-degenerativa que, como se mencionó anteriormente, tiene afectaciones motrices. Esto sugiere, como en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington o de Alzheimer, la pérdida de neuronas en el cerebro, en este caso, de las NDa A9 de la *SNpc* (ver Figura 2) (Daviaud *et al.*, 2014). Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer, y afecta al 2% de la población mundial de mayores de 60 años, o 5-35 personas por cada 100 000 por año (Poewe *et al.*, 2017; Daviaud *et al.*, 2013). Clínicamente, los síntomas más característicos relacionados a la disfunción del movimiento -descritos inicialmente por James Parkinson en su “Essay on the Shaking Palsy” en 1817- son el temblor, la bradiscinesia (lentitud y dificultad para iniciar movimientos), rigidez en los músculos y pérdida de los reflejos posturales. Sin embargo, más recientemente se han descrito una gran variedad de síntomas no motrices relacionados a la enfermedad como disfunción autónoma, alteraciones cognitivas, problemas de sueño, disfunción del olfato, depresión etc. (Jiang & Dickson, 2017; Parkinson, 1817; Daviaud *et al.*, 2013).

En la PD, debido a la muerte de las NDa en la *SNpc*, se pierde la señalización dopaminérgica en el estriado. Ésto produce una alteración en los circuitos estriatales mencionados anteriormente, pues al disminuir o abolirse la Da proveniente de la *SNpc*, ocurre una disminución de la actividad de la vía directa y un incremento en la actividad de la vía indirecta (Mallet *et al.*, 2006; Kravitz *et al.* 2010; revisado en Zhai *et al.*, 2019). Se ha propuesto que esto sea mediado por un desbalance/una elevación en la señalización

colinérgica, lo cual conlleva a una hiperactivación general de las señales GABAérgicas hacia las áreas tálamocorticales y del tallo cerebral (Poewe *et al.*, 2017; Tanimura *et al.*, 2017). En general, este desbalance provoca los síntomas motrices mencionados.

2.4- Características de la enfermedad de Parkinson

Los síntomas mencionados en la sección anterior son visibles a nivel conductual, sin embargo, también es posible estudiar el desbalance sináptico a escalas más pequeñas dentro del estriado. Numerosos trabajos han empleado la imagenología de calcio en conjunto con la teoría de redes para estudiar la actividad de poblaciones neuronales conformadas por decenas de células en roedores parkinsonianos (Carrillo-Reid *et al.*, 2008, Carrillo-Reid *et al.* 2009, Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Estas redes conectan entre sí y forman microcircuitos entre la escala de sinapsis celular y los circuitos a gran escala, como aquellos formados entre los ganglios basales y la corteza, SN, etc. Existen pruebas consistentes de que los incrementos en la fluorescencia detectados por imagen de calcio coinciden con los tiempos en los cuales las células presentan cambios en el potencial de membrana en forma de *burst* (período de disparos de potenciales de acción rápidos seguido de un tiempo sin disparos, mayor al tiempo usual entre potenciales) (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Inclusive, se determinó que los transitorios sólo son visibles si se presentan *burst* con al menos dos potenciales de acción (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

En particular, el estriado está formado por neuronas (interneuronas GABAérgicas y colinérgicas) conectadas entre sí por medio de conexiones sinápticas dentro de un área <100 µm. Por esta razón, se hicieron análisis para determinar si se formaba una estructura modular a escala del tejido (es decir, con grupos de neuronas que se comunican con otros grupos/entre sí) (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; 2009). En efecto, se determinó la presencia de grupos de co-actividad en el estriado y se hicieron más estudios para comprender los patrones de dicha actividad (Carrillo-Reid *et al.*, 2009; 2011; Pérez-Ortega 2016).

Un dato interesante es que, al igual que en otros sistemas, la adición del agonista glutamatérgico NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) produce un incremento en la actividad neuronal *in vitro* y, en el estriado, un incremento en la movilidad *in vivo*. Este estímulo permite analizar los patrones de actividad de microcircuitos estriatales, puesto que en condiciones basales muestra muy poca actividad espontánea (Carrillo-Reid *et al.*, 2008).

Finalmente, en estos trabajos se observó que la actividad estriatal (bajo un estímulo) ocurre de manera sincronizada, con alternancia entre grupos de neuronas y con cierta jerarquía, supuestamente regida por la señalización cortical, que permitiría integrar las señales y dar lugar al inicio de acciones.

Dado el papel que juega el estriado en la PD, se estudió su actividad en modelos de animales hemi-parkinsonianos (lesionados unilateralmente con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como se menciona más adelante) y se observó una clara diferencia en la actividad de los microcircuitos estriatales (Jaídar *et al.*, 2010). Las principales diferencias a resaltar son la aparición de una hiperactividad neuronal y una pérdida de la jerarquía que conlleva a la pérdida de la alternancia entre distintos grupos, teniendo así una pequeña población neuronal que concentra casi toda la actividad (Jaídar *et al.*, 2010). La actividad estriatal estaría entonces siendo regulada en parte por la inervación dopaminérgica proveniente de la SNpc y de su regulación sobre la actividad colinérgica estriatal (Carrillo-Reid *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, dicha inervación dopaminérgica se pierde en pacientes con PD a causa de la muerte de las NDa de la SNpc.

A pesar de que su muerte no es monocausal, está altamente atribuida a la acumulación en citoplasma y neuritas de la proteína presináptica α -Sinucleína (α S) y formación de los cuerpos de Lewy (Jiang & Dickson, 2017). La aparición de estos cuerpos, denominada “patología de Lewy”, ocurre inicialmente en las neuronas del sistema olfatorio, aunque también es visible en las regiones límbicas y en la neocorteza conforme progresa la enfermedad (Poewe *et al.*, 2017). Con relación a dicha progresión, la PD consta de una etapa temprana pre-clínica en donde la muerte neuronal es muy localizada en la zona ventrolateral de la SNpc, y una etapa tardía en la cual la muerte se extiende en la SN. También se ha clasificado la enfermedad en distintos fenotipos según la edad en la que se detecten los síntomas motrices y la demencia, así como con la gravedad con la que se presenten (Halliday & McCann, 2010; Daviaud *et al.* 2013). En la siguiente Figura 2 se muestra un esquema y una imagen comparando un cerebro sano con un cerebro de paciente con Parkinson.

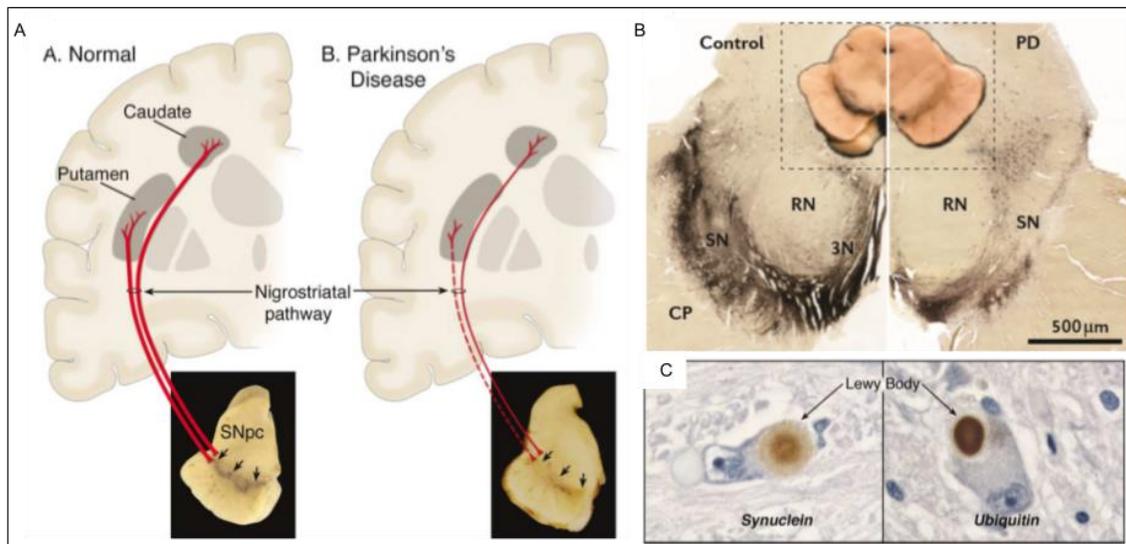


Figura 2. Pérdida de la vía nigro-estriatal en pacientes con enfermedad de Parkinson. En A) Esquema que muestra la vía nigro-estriatal que va desde la SNpc hasta los núcleos caudado y putamen en un sujeto sano comparado con un paciente con Parkinson. Tomado de Dauer & Przedborski, 2003. B) Tinción histológica para Tirosina hidroxilasa en un corte coronal de cerebro. Se observa una despigmentación en la SN del organismo enfermo (derecha) en comparación con el sano (izquierda). Tomado de Poewe *et al.*, 2017. C) Inmunotinción para α -Sinucleína y ubiquitina mostrando los cuerpos de Lewy en NDa. Tomado de Dauer & Przedborski, 2003.

A pesar de la numerosa cantidad de estudios que se han hecho para elucidar la etiología de la PD, no se conocen todos los mecanismos y causas que la provocan. Hasta la fecha, se sabe que están involucrados los factores ambientales, como la exposición a neurotoxinas, solventes orgánicos y agentes contaminantes (Goldman, 2014), además de causas genéticas como la mutación en el gen de la α S o en la ubiquitin carboxil-terminal hidrolasa L1 (Shimohama *et al.*, 2003). Estas mutaciones afectan compartimentos como la mitocondria, lisosoma o endosomas, que alteran distintos procesos celulares como el metabolismo celular, la degradación de proteínas y respuestas al estrés (Jiang & Dickson, 2017).

2.5- Tratamientos para la enfermedad de Parkinson

A pesar de los avances que se han hecho en el estudio de la PD, los tratamientos para ésta son muy limitados. Se han desarrollado distintas alternativas como la administración de combinaciones de fármacos (relacionados a la vía de síntesis de la Da), o bien mediante la estimulación de núcleos profundos del cerebro. Sin embargo, el principal tratamiento sigue siendo, desde hace más de 50 años, la administración del precursor de la dopamina L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA). Uno de los problemas de estos tratamientos es que no curan la enfermedad, sino que disminuyen los síntomas, y a pesar de mejorar la calidad de vida

por muchos años, no impide el progreso de la degeneración y la aparición de síntomas no motrices (Poewe *et al.*, 2017). Además, la administración de fármacos como la L-DOPA tiene efectos secundarios a largo plazo, como los trastornos involuntarios del movimiento, o discinesias, que a su vez son tratadas con fármacos como la amantadina, que tiene efectos negativos como alucinaciones, confusión, náusea, etc. (Tanimura *et al.*, 2017).

Sin mucho éxito y sin un seguimiento exhaustivo, se han propuesto otro tipo de tratamientos además de los farmacológicos, como la terapia génica. En este campo se han propuesto el uso de vectores virales para inducir la expresión de factores de crecimiento o enzimas necesarias para la producción de neurotransmisores como la Tirosina hidroxilasa (TH), expresada en estriado. También se ha propuesto la administración del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), relacionado con la protección y regeneración de axones de neuronas dopaminérgicas (Kordower & Bjorklund, 2013; Poewe *et al.*, 2017).

Otros estudios han propuesto la terapia de reemplazo celular, que consiste en la inserción de células en las zonas afectadas del cerebro, con el fin de recuperar la función perdida. Las principales desventajas que representan estas terapias han sido la baja integración celular y supervivencia, además de la dificultad del seguimiento *in vivo* (Daviaud *et al.*, 2013). En el caso de la PD, se han hecho injertos de neuronas dopaminérgicas aisladas de mesencéfalo ventral humano en desarrollo en el cerebro de pacientes (Freed *et al.*, 2001; Piccini *et al.*, 1999) con resultados variables o inclusive perjudiciales para los pacientes debido a la aparición de discinesias inducidas por el trasplante (revisado en Backer *et al.*, 2016). Se han hecho también injertos de NDa derivadas de células troncales embrionarias (ESCs) o de células pluripotentes inducidas (iPSC) en modelos animales de la PD. Estos trabajos muestran una mejoría conductual y motora en ratas hemiparkinsonianas trasplantadas en el estriado (Kim *et al.*, 2002); sin embargo, no permiten la recuperación de la vía nigro-estriatal, pues las NDa no son trasplantadas en la SN (Díaz-Martínez *et al.*, 2013). Como se mencionó, las principales complicaciones implican la supervivencia del trasplante, para lo cual se han agregado factores tróficos, agentes antioxidantes, anti-apoptóticos, etc. (Liu and Huang 2007).

2.6- Modelos para el estudio de la enfermedad de Parkinson

Con el fin de entender la fisiopatología de la PD y proponer nuevos tratamientos, se han generado diversos modelos *in vivo* e *in vitro* que recapitulan los componentes de la enfermedad. De los compuestos más empleados para generar dichos modelos son la 6-OHDA, el MPTP y la rotenona. El MPTP, por ejemplo, es un compuesto altamente lipofílico, capaz de penetrar la barrera hematoencefálica y que una vez dentro del cerebro es metabolizado en un compuesto afín al transportador de Da (DAT), y que resulta ser tóxico

en las neuronas dopaminérgicas (Lopes *et al.*, 2017). Estos iones MPP⁺ se acumulan en las NDa y provocan estrés oxidativo o producción de radicales libres que conducen a la muerte neuronal.

Los modelos *in vivo* implican la inyección intranigral o exposición sistémica de los componentes mencionados. Otro modelo *in vivo* incluye el uso de animales transgénicos con mutaciones en el sistema de la Da como la TH, Nurr1, receptor D2 de Da, etc. (Shimohama *et al.*, 2003) o bien con mutaciones que producen alteraciones metabólicas relacionadas con la muerte de las NDa (Jiang & Dickson, 2017). Por otro lado, los modelos *in vitro* abarcan principalmente cultivos neuronales primarios y cultivos de líneas celulares a los que se les administra 6-OHDA.

Las características que intentan reproducir estos modelos incluyen la detección relativamente fácil de los síntomas motrices (como la prueba de rota rod, rotación asimétrica inducida por suministro de anfetamina) o la pérdida gradual y selectiva de las NDa. Estos han permitido avances en el campo de la medicina molecular, y el descubrimiento de agentes neuroprotectores (Shimohama *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2017).

Ambos modelos presentan ventajas y desventajas: los cultivos son relativamente fáciles de mantener, disminuyen el número de animales empleados y su sufrimiento, además de permitir realizar estudios celulares de morfología, función y respuesta a químicos, aunque no permiten estudiar las relaciones intercelulares presentes en el microambiente original (Humpel, 2015); mientras que los modelos *in vivo*, que sí lo mantienen, son más caros, de largo plazo, y no permiten probar distintas condiciones en un mismo animal, por lo cual la reproducibilidad se dificulta (Daviaud *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, se han desarrollado modelos *ex vivo* que consisten en mantener en cultivo rebanadas íntegras de cerebro, lo que permite estudiar aspectos estructurales y sinápticos, pues mantienen la arquitectura original del tejido (Humpel, 2015; Cho *et al.*, 2007). Tras diversas modificaciones, Stoppini, en 1991 estableció la técnica de cultivo en una membrana semipermeable. A partir de estos cultivos se han desarrollado modelos que permiten estudios tanto fisiológicos como farmacológicos -electrofisiológicos, de transferencia genética, respuestas a químicos- (Daviaud *et al.*, 2013), y de manera importante, el co-cultivo de dos o más áreas del cerebro, lo cual ha permitido mantener *in vitro* ambientes complejos o vías como la cortico-espinal, co-cultivos simulando la barrera hematoencefálica-hipotálamo, la vía cortico-estriatal, o la vía nigro-estriatal (Humpfel, 2015; Lopes *et al.*, 2017; Ullrich, Daschil & Humpfel 2011). Estos modelos han abierto las puertas al estudio de la regeneración de vías afectadas durante enfermedades neurodegenerativas, que por lo general representan largas distancias, como la PD (Humpfel, 2015).

Por este motivo, varios grupos han establecido técnicas de cultivo organotípico de cortes sagitales con el fin de estudiar distintos aspectos de la PD: se han empleado las neurotoxinas 6-OHDA y rotenona para lograr la degeneración de la vía (Kearns *et al.*, 2006; Stahl *et al.*, 2009); otros equipos de trabajo compararon la degeneración de las neuronas dopaminérgicas induciendo el daño con 6-OHDA o mecánicamente con un corte en el fascículo medial cerca de la SN. Se mostró una mayor afectación en la cantidad de células positivas para TH con el corte mecánico, además de la pérdida de las proyecciones de otros tipos neuronales, proponiendo así un modelo que permite discriminar entre etapas tempranas y tardías de la enfermedad (Cavaliere, Vicente, & Matute, 2010). Más recientemente, se empleó un ángulo de 14 grados con el fin de inducir la degeneración de la vía sin necesidad del uso de neurotoxinas o cortes mecánicos adicionales, y se comprobó que se mantuviera la viabilidad de los cultivos a lo largo de la degeneración de la vía (Daviaud *et al.*, 2014). En una revisión publicada en 2013, Nicolas Daviaud y colaboradores resumen los trabajos que se han realizado, en los cuales se busca optimizar la terapia de reemplazo celular en cultivos organotípicos representantes de enfermedades neurodegenerativas (Daviaud *et al.*, 2013).

En una revisión reciente (Figura 3), Martins Lopes y colaboradores resumen los tipos de modelo empleados para el estudio de la PD en cultivo, así como su grado de dificultad, ventajas y desventajas. La siguiente figura muestra esquemas de los modelos mencionados en la revisión y de los cuales se habló anteriormente.

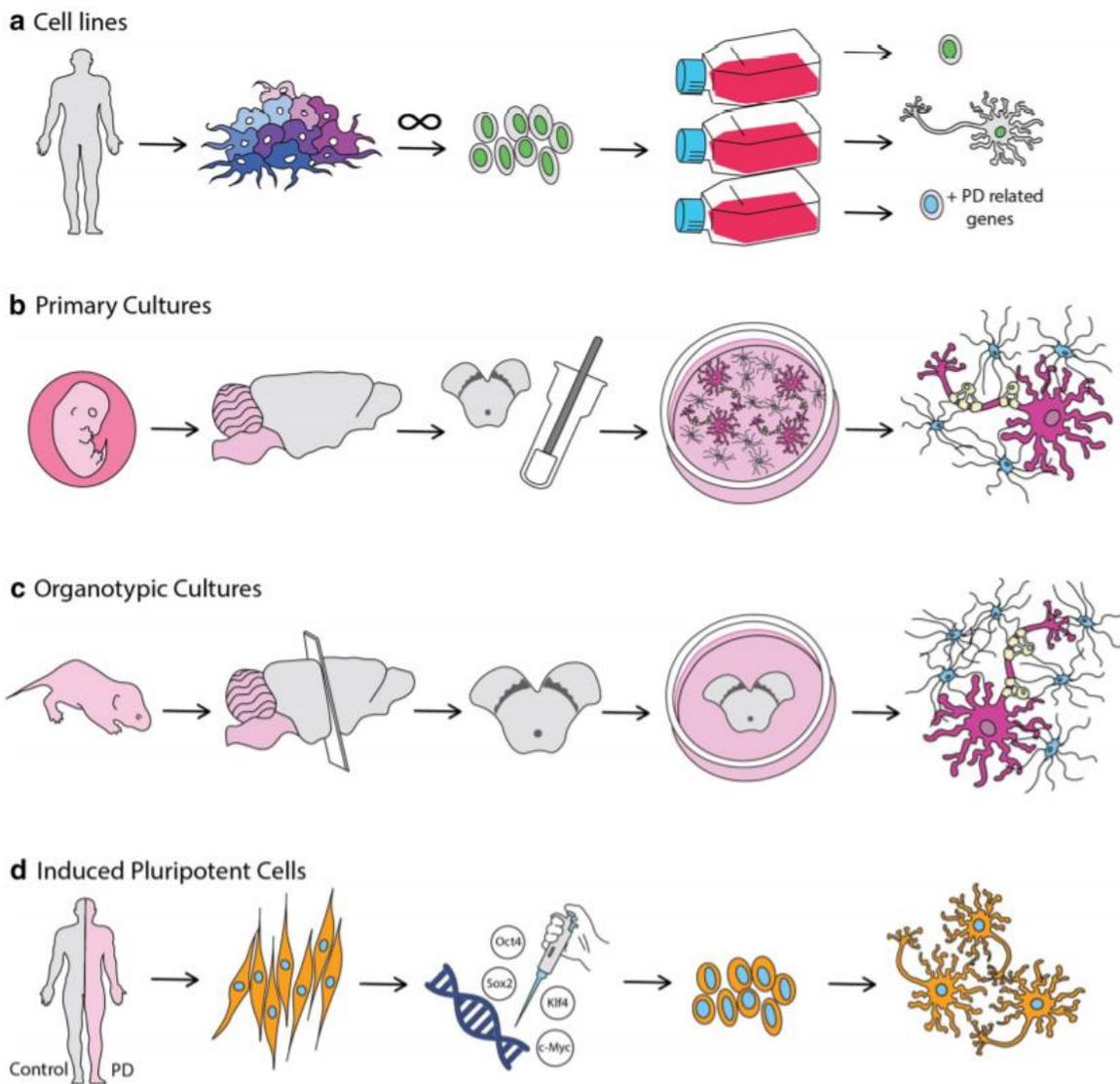


Figura 3. Figura modificada de la revisión publicada por Lopes *et al.*, en 2017. Distintos modelos para estudiar la enfermedad de Parkinson.

El uso de cultivos organotípicos parece entonces un buen modelo para el estudio de enfermedades degenerativas, puesto que requiere de poco tiempo en comparación con los trabajos *in vivo*, y permite estudiar la integración y migración e interacción de células trasplantadas con el ambiente del hospedero. Además, el establecimiento de un protocolo en el que no se necesita ningún corte o tratamiento adicional para inducir la degeneración de la vía nigroestriatal suma una ventaja al modelo (Daviaud *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, parte de las opciones para contrarrestar las enfermedades neurodegenerativas ha sido el trasplante celular. En el modelo parkinsoniano, ha resultado efectivo el trasplante de NDa en el estriado, mientras que los trasplantes en SN han resultado exitosos solo con el uso de factores que estimulen el

crecimiento y direccionamiento axonal, como se muestra en el trabajo de Díaz-Martínez, 2013. En dicho trabajo se demostró que el trasplante en la SN de NDA derivadas de ESCs, en conjunto con el trasplante en estriado de células HEK que expresan a la Semaforina 3C (Sema3C), promueven el direccionamiento axonal de las NDA hacia la SN. Asimismo, se vieron efectos positivos en la conducta de los animales tratados (Díaz-Martínez *et al.*, 2013).

2.7- Semaforinas, guías para el crecimiento axonal de neuronas dopaminérgicas

Las Semaforinas son una familia de proteínas solubles o de unión a membrana. Se expresan en una gran cantidad de tejidos tanto adultos como embrionarios, y juegan un papel relevante tanto en la atracción como la repulsión de los axones (Liu & Strittmatter, 2001). En efecto, se describieron inicialmente como inhibidores del crecimiento axonal (Steinbach, Volkmer & Schlosshauer, 2002), y posteriormente como guías (Sema 3C) para el crecimiento de las neuronas del cuerpo calloso (Niquille *et al.*, 2009). Forman parte de los organizadores sinápticos, clasificadas como factores difusibles secretados liberados por las células blanco, que participan en la maduración y predisposición hacia la sinaptogénesis (Yuzaki, 2017). Dicha familia se divide en ocho clases, entre las cuales la 3 ha sido la mejor caracterizada con seis miembros (Sema 3A-F). Además de su papel en el sistema nervioso central, las Sema se encuentran presentes en otros tejidos, llevando a cabo funciones de migración celular, crecimiento tumoral o respuesta inmune (Liu & Strittmatter, 2001).

La respuesta celular a la Sema está mediada por la unión de las Sema a sus receptores Neuropilinas y/o Plexinas en las células blanco. En el caso de la Sema3C, requiere de ambas (Liu & Strittmatter, 2001; Yuzaki, 2017; Van Battum, Brignani & Pasterkamp, 2015). Las Sema son capaces de inducir el crecimiento axonal por medio de la modulación del citoesqueleto del cono de crecimiento axonal. De modo simplificado, la Sema se une a su receptor plexina (o Neuropilina/plexina en el caso de la familia 3) la cual a su vez activa GTPasas que llevarán a cabo cascadas de señalización que concluirán en la modificación del citoesqueleto (Liu & Strittmatter, 2001). En la Figura 4 se muestra un esquema del mecanismo de guía axonal y se esquematiza la familia de las semaforinas y sus receptores.

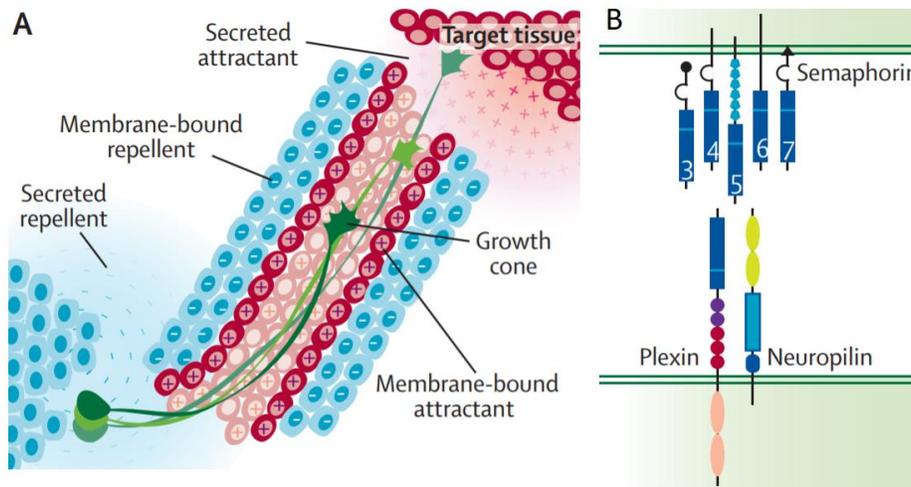


Figura 4. Guía axonal y familia de las Semaforinas. A) Esquema de guía axonal durante el desarrollo, dada por señales atractoras y repulsoras que tienen efecto sobre el cono de crecimiento axonal. B) Esquema de la familia de las Semaforinas y sus principales receptores. Figura tomada de Van Battum, Brignani & Pasterkamp, 2015.

En particular, las Sema3 están altamente implicadas durante el desarrollo en el crecimiento de los axones de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, permitiéndoles llegar hasta el estriado (Hernández-Montiel *et al.*, 2008; Carballo-Molina *et al.*, 2016). En efecto, la Sema3C expresada a lo largo de una línea longitudinal en el cerebro medio ventral al día E11.5, atrae los axones de las NDa -que expresan los receptores neuropilina 1 y/o 2 (Nrp1-2)- en desarrollo y promueve su crecimiento. Un día embrionario después, se activa la expresión de la Sema3C en el pretectum, conduciendo a los axones hacia el estriado. En este último se expresa la Sema3A, que funge únicamente como promotor de crecimiento axonal, en el momento en el que los axones de las NDa llegan al día E14 (Hernández-Montiel *et al.*, 2008). Este efecto también se ha visto en neuronas derivadas de ESCs de ratón y de humano (hESC) *in vitro* (Tamariz *et al.*, 2010; Carballo-Molina *et al.*, 2016). El uso de las Sema3 podría entonces representar una gran ventaja en los modelos de regeneración de vías en los cuales los axones deben de recorrer largas distancias para poder formar una conexión sináptica con sus células blanco.

En efecto, estos resultados dan lugar a la idea de direccionar los axones de las NDa derivadas de ESCs trasplantadas en la SN con el fin de restaurar la vía nigro estriatal perdida durante la PD, y restablecer así conductas relacionadas con las atrofias motrices. Como se mencionó, anteriormente se demostró que la expresión de Sema3C por células HEK293 trasplantadas tuvo un efecto positivo en la atracción de los axones de las NDa injertadas en la SN, en conjunto con una mejoría en la conducta en ratas (Díaz-Martínez *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de células no neurales como las HEK en pacientes podría tener efectos secundarios,

por lo cual se probó en células cultivadas el uso de un hidrogel biocompatible como método de liberación de la Sema3C, para reemplazar a las células HEK293 (Carballo-Molina *et al.*, 2016). En dicho trabajo se demostró que el hidrogel PuraMatrix permite la liberación de Sema3C y la atracción/crecimiento de los axones de NDA provenientes tanto de células de rata como de humano.

2.8- Hidrogeles como método de liberación de Sema3C

Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos que pueden incorporar grandes cantidades de agua (hasta un 90% de su peso seco), con una gran versatilidad de composición que le confiere distintas propiedades (rigidez o elasticidad, densidad, características de polimerización), y la capacidad de imitar ambientes como la matriz extracelular del cerebro (Aurand, Lampe & Bjugstad, 2012). Además, debido a su capacidad absorbente, pueden incorporar diversos componentes como drogas, factores de crecimiento, factores neurotróficos como el CNTF (factor neurotrófico ciliar) o GDNF e inclusive células (Koutsopoulos & Zhang, 2013), por lo cual se han empleado frecuentemente para la entrega y liberación gradual de compuestos, por ejemplo, de Da y noradrenalina en el estriado en modelos parkinsonianos de ratas (revisado en Aurand, Lampe & Bjugstad, 2012). Algunos de estos polímeros son biológicamente inertes, por lo cual, a diferencia de algunos biomateriales naturales como la matriz de colágena o el matrigel -que presentan desventajas como la alta variabilidad, posible contaminación y rechazo del hospedero- son biocompatibles. Este término hace referencia a que no se ocasionan respuestas por parte del sistema inmunitario, es decir, que es histocompatible con el hospedero (Carballo-Molina & Velasco, 2015; Aurand, Lampe & Bjugstad, 2012).

Además de ser transportadores de componentes, los hidrogeles presentan características que facilitan la regeneración axonal de tejidos dañados si se usan como cama de crecimiento o relleno de la zona dañada, por lo cual se han usado tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro* para la regeneración axonal (Carballo-Molina & Velasco, 2015).

En particular, el hidrogel PuraMatrix está constituido por 16 repeticiones del péptido arginina-alanina-aspartato-alanina (RADA16), que permite el crecimiento axonal y la formación de sinapsis *in vitro*, además de la captura y liberación de diversas proteínas (Carballo-Molina *et al.*, 2016, Holmes *et al.*, 2000). El hidrogel PuraMatrix es una matriz sintética que se usa para crear micro ambientes para cultivo celular compuesto por aminoácidos estándar (1% w/v) y 99% agua. Éste se auto-ensambla bajo condiciones fisiológicas (pH, temperatura, concentración iónica) en un hidrogel de estructura fibrosa de escala nanométrica. Los hidrogeles se degradan dependiendo de su estructura y del contacto que tengan con el agua. Por ejemplo, en contacto con tejidos *in vivo*, es

principalmente por la actividad enzimática de metaloproteasas (Carballo-Molina *et al.*, 2016).

Antecedentes

En conjunto, los resultados anteriores llevaron a la elaboración de un modelo de cultivo organotípico para estudiar la guía axonal de NDa diferenciadas de hESCs (Kriks *et al.*, 2011) que expresan GFP, en conjunto con un hidrogel biocompatible que libere progresivamente Sema3C (Carballo-Molina *et al.*, 2016). El uso de la Sema3C permitiría el direccionamiento axonal de las neuronas depositadas sobre la SN, proceso al cual es posible dar seguimiento con el uso de estos cultivos.

Para esto, el Dr. Carballo-Molina estandarizó las condiciones de cultivo de rebanadas de ratas de 7-8 días de nacimiento. Empleó el método descrito por Daviaud *et al.*, 2013, en el cual el mismo corte mecánico al momento de realizar la rebanada corta la vía nigro-estriatal. Realizó pruebas de viabilidad y de integridad de la vía nigro-estriatal por medio de inmunofluorescencia, y estableció las condiciones de trasplante de las NDa derivadas de hESCs en la SN. Finalmente, se estableció el método del implante del biopolímero a lo largo de la vía en los cultivos organotípicos (Carballo-Molina, datos no publicados).

Tras realizar un trasplante, es necesario comprobar que las células se integren al tejido hospedero (en este caso, las rebanadas), para lo cual se realizaron diversas pruebas, de inmunofluorescencia y electrofisiológicas, como testigos de la identidad e interacción del co-cultivo. Las inmunofluorescencias mostraron células GFP positivas para TH y Tuj1 en el área de la SN, y se pudo cuantificar un direccionamiento hacia el sitio de liberación de la Sema3C (estriado) como se observa en la Figura 5. Sin embargo, no se pudo obtener un registro electrofisiológico característico de NDa de 31 días de maduración por medio de la técnica de patch clamp (no se muestran datos).

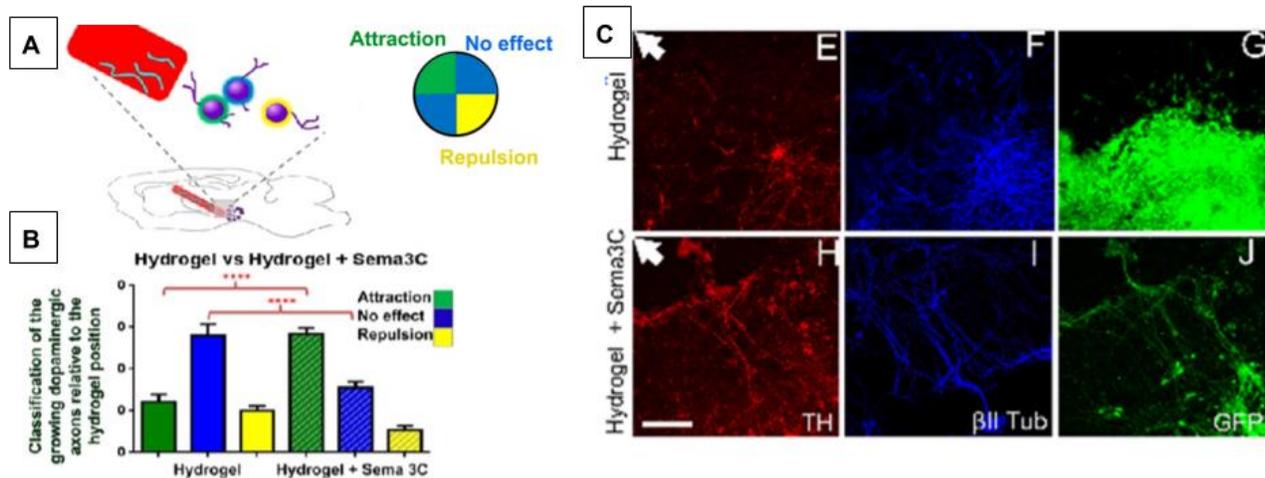


Figura 5. La Semaforina 3C liberada por el hidrogel desde el estriado promueve el crecimiento y direccionamiento de los axones de las NDa trasplantadas al día 21 de diferenciación. **A)** esquema del experimento; **B)** gráfica con los datos obtenidos; **C)** inmunofluorescencia para TH y β tubulina III en las células GFP+ del trasplante. La flecha indica la dirección del estriado en la rebanada. *Oscar Carballo-Molina, no publicado.*

Dados los antecedentes mencionados, parece relevante seguir con el establecimiento de las condiciones que permitan la caracterización electrofisiológica, así como la obtención de pruebas que indiquen la correcta regeneración de la vía nigro-estriatal en el modelo propuesto.

3.1- Hipótesis

El uso de Sema3C, liberada desde un hidrogel biocompatible, permitirá el direccionamiento de axones de NDa diferenciadas de células troncales humanas GFP desde la SN hacia el estriado, restableciendo anatómica y/o funcionalmente la vía nigro-estriatal en un modelo parkinsoniano de cultivo organotípico.

3.2- Objetivo general

Obtener un modelo de co-cultivo organotípico y NDa en el cual el direccionamiento axonal ocasionado por la liberación de Sema3C por un hidrogel permita una integración del trasplante y regeneración parcial de la vía nigro estriatal

Objetivos particulares

- Corroborar la maduración e identidad de las neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir de las hESCs con la finalidad de trasplantarlas en la SN en rebanadas de cultivos organotípicos.
- Obtener cultivos organotípicos viables que a largo plazo presenten características de la PD.
- Evaluar el efecto de las NDa en la rebanada y probar sus propiedades funcionales.

4- Métodos

4.1- Diferenciación y maduración de neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias humanas

La diferenciación se realizó a partir de la línea celular H9 de hESC con expresión de GFP constitutiva bajo el promotor de la fosfogliceraldehído quinasa (PGK). Éstas se mantuvieron sobre fibroblastos embrionarios de ratón en medio KSR (knockout reemplazo de suero) al 20% en DMEM hasta el momento de iniciar la diferenciación, momento en el que se pasaron a cajas con matrigel en medio KSR con DMEM, 15% KSR, 2 mM de L-glutamina y 10 μ M de β -mercaptoetanol. Este medio se fue reemplazando progresivamente con medio N2 a lo largo de la diferenciación. Se siguió el método descrito por Kriks *et al.* en 2011 resumido en la Figura 6. En breve, se hace una inducción de cerebro medio inhibiendo proteínas SMAD (SB431542 10 μ M y LDN193189 100 nM) con el fin de inhibir las vías de las BMP y Nodal/Activina/TGF β (factor de crecimiento transformante β). Esto promueve la inducción neural. Además, se agrega CHIR9901 (3 μ M) para inducir la formación de la placa del piso (inhibidor de GSK3 β , glucógeno sintasa quinasa 3 β), que activa la vía de Wnt/ β -catenina, la cual es necesaria para la expresión de LMX1a (que también regula LMX1b) de manera coordinada con FOXA2, marcador de la placa del piso necesario para la formación del cerebro medio. También se activa la vía de SHH (con purmorfamina 2 μ M), y con FGF8 (factor de crecimiento de fibroblastos 8, 0.1 μ g/mL), también regulada por FOXA2. LMX1a regula directamente la expresión de genes post mitóticos característicos de NDa como NURR1, PITX3, que a la vez regulan la expresión de TH (Arenas, Denham & Viellaescusa 2015; Kirks *et al.*, 2011). La adición de los distintos suplementos se hace de manera tiempo-específica a lo largo de un protocolo de diferenciación de 21 días, como se detalla en la Figura 6.

Una vez en la etapa de maduración, las células se sembraron sobre pozos previamente tratados con poli-L-ornitina (PLO) (15 µg/ml) durante una noche (recomendado) o una hora. Tras un lavado con PBS, se trataron con una solución de Fibronectina 5 µg/ml y Laminina 1 µg/ml. La densidad celular, dependiendo del experimento a realizar, fue de 50-100 mil células por pozo (patch clamp, HPLC), 250 mil (cámaras de crecimiento axonal) ó 2 millones (pozos de 60 mm para trasplante sobre la rebanada cerebral), en medio de maduración Neurobasal suplementado con N2-supplement (GIBCO), B-27-supplement (GIBCO), Glutamax™ I (GIBCO), antibióticos (penicilina-estreptomina, 50 U/ml, GIBCO) y distintos factores como BDNF 20 ng/ml, GDNF 20 ng/ml, ácido ascórbico 200 µM, AMPc 500 µM, DAPT 10 µM y TGFβ3 1 ng/ml. El medio fue reemplazado cada 2-3 días.

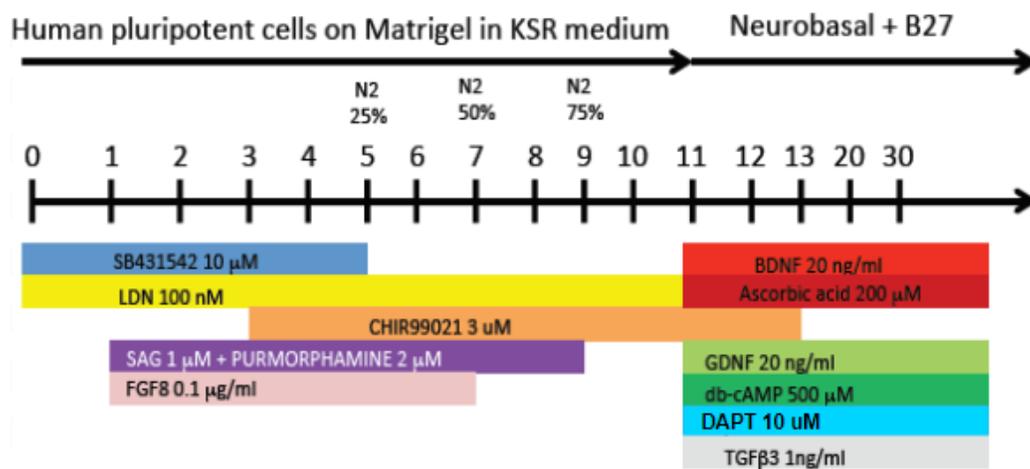


Figura. 6. Protocolo de diferenciación de hESC a NDa. Esta figura fue creada en el laboratorio a partir del protocolo de diferenciación descrito en Kriks *et al.*, 2011. Explica de manera temporal los suplementos y cambios de medio necesarios para la diferenciación a NDa.

4.2- Cultivo organotípico de la vía nigro-estriatal.

Siguiendo los protocolos establecidos anteriormente por Stoppini *et al.*, 1991 y posteriormente modificado por Daviaud *et al.*, 2014 se emplearon ratas neonatas de 7 días, de las cuales se obtiene el cerebro inmediatamente después del sacrificio. Este se corta sagitalmente por la mitad en rebanadas que incluyen parte del estriado y la SN (intentando no crear ningún ángulo adicional al corte) y se colocan y pegan ambos hemisferios en un vibratomo con cianocilato adherente. Se sumerge en solución fisiológica (Gey's salt solution, Krebs, colina, sacarosa o Hank's oxigenado previamente al 95% O₂ y 5% CO₂) fría. La solución Gey's contiene 10 mM de NaCl, Dextrosa 36 mM, NaOH₃ 27 mM, KH₂PO₄ 0.22

mM, MgSO₄ 0.28 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2.21 mM, MgH₂PO₄ 1.8 mM y CaCl₂ 1.2 mM. Las rebanadas se realizaron de 350 µm y se colocaron sobre solución salina con el fin de realizar un lavado (en el caso de la colina, para evitar el exceso) y para disminuir la probabilidad de contaminación. Se seleccionaron aquellas rebanadas que contenían la vía nigro-estriatal, y se pasaron por un lavado en el medio en el que se sembrarán. Finalmente se colocaron sobre insertos de policarbonato con poros de 0.4 µm y diámetro de 30 mm (Cell Culture Inserts, Millipore™), en multipozos de 60 mm (estos se atemperan previamente una hora en la incubadora con 1 ml de medio). El medio se cambió cada dos o tres días: medio Neurobasal (Neurobasal medium GIBCO (- L-Glutamina) con suplemento B27, glucosa 6.5 mg/ml, glutamax y antibióticos (penicilina-estreptomicina 50 U/ml, GIBCO).

4.3- Inmunofluorescencia para rebanadas de cultivo organotípico

Las rebanadas se fijaron con paraformaldeído al 4% durante al menos 2 h, hasta una noche, tras un lavado con PBS estéril de 5 min. Posteriormente a la fijación se realizaron tres lavados de 10 min y se guardaron a 4 °C, o bien se comenzó la inmunofluorescencia.

Las rebanadas se incubaron en solución de bloqueo PBS, tritón X-100 al 0.3% y suero normal de cabra al 10% durante una hora, a temperatura ambiente, en agitación suave. Tras este tiempo se dejó incubando en solución de anticuerpo primario durante una noche a 4 °C.

Al día siguiente se realizaron dos lavados en PBS y se incubó el anticuerpo secundario por dos horas a temperatura ambiente en agitación suave (Tabla 1). Transcurrido el tiempo se realizó un lavado más, se incubó en solución PBS y Hoechst 1 ng/ml en PBS por 10 min, se realizaron dos lavados más, y se montaron las muestras en medio de montaje (Aqua Poly/Mount, Polysciences, inc.) sobre un portaobjetos. Posteriormente se observaron en el microscopio de fluorescencia o confocal. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 800).

En la siguiente tabla se muestran los detalles de los anticuerpos primarios empleados.

Tabla 1

Marcador	Dilución	Características
TH	1:500	Pel-Freez, Anti-Tyrosine Hydroxylase, rabbit
Anticuerpo secundario	1:1000	Goat anti-rabbit IgG con Alexa 568

4.4 Inmunofluorescencia para cultivos de NDA

Las células se fijaron sobre las cajas de 24 pozos con PFA al 4% (a temperatura ambiente al momento de colocarlo) por 20 min a 4°C tras un lavado con PBS, igualmente a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se realizaron 2 lavados más y se guardaron a 4°C. El procedimiento de inmunofluorescencia es el mismo que para las rebanadas. Los anticuerpos primarios se detectaron con los anticuerpos secundarios Alexa-488, 568 o 647. En la Tabla 2 se muestran los detalles de los anticuerpos empleados.

Tabla 2

Marcador	dilución	Características
TH	1:500	PeI-Freez, Anti-Tyrosine Hydroxylase, rabbit
Tuj1	1:3000	Covance, Anti-beta-Tubulin III, mouse
Map2	1:500	SIGMA, Anti-Microtubule associated protein 2, mouse
Nrp1	1:500	R&D Systems, Anti-Human Neuropilin 1, rabbit

4.5- Pruebas de liberación de dopamina

4.5a HPLC

Para esta prueba se emplearon células de 60 días en cultivo en monocapa, a las cuales se les quitó el medio y se incubaron durante 20 minutos en una solución salina normal con NaCl 140 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1.2 mM y MgCl₂ 1 mM. Esta solución se recuperó, y se incubaron otros 20 minutos con una solución de *alto potasio* con NaCl 44 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 1.2 mM y MgCl₂ 1 mM. Ambas soluciones se ajustaron a pH=7.3 y Osm≈260 mosmol/l. Las muestras recuperadas se llevaron al laboratorio de la Dra. Luisa Rocha (Cinvestav sede sur, Departamento de Farmacobiología) en donde se pasaron por una columna líquida de alta resolución para medir los niveles de Da y DOPAC (ácido dihidroxifenilacético, uno de los metabolitos de la vía de síntesis de la Da).

4.5b Amperometría

El ensayo de amperometría se realizó en una cámara de perfusión con las mismas soluciones que el ensayo por HPLC. Al igual que para los registros electrofisiológicos por patch clamp, se colocaron las células bajo un microscopio con objetivos de inmersión y se hizo contacto con un microelectrodo. Sin embargo, el microelectrodo consta de una fibra de carbono que nos permite medir la oxidación de las catecolaminas liberadas

somáticamente por la célula. El electrodo nos permite medir las corrientes obtenidas de la oxidación. Los videos se tomaron durante un minuto para registrar la actividad espontánea, un minuto con perfusión de solución de KCl 100 mM, y un minuto sin estímulo.

4.6- Ensayos de viabilidad

Para determinar la viabilidad de las rebanadas se realizaron distintas pruebas:

- Detección de actividad metabólica por presencia de hidrólisis espontánea de compuestos derivados de ésteres asociados a fluoróforos, como la calceína AM (acetoximetiléster).
- Detección de los niveles de muerte celular -hebras de ADN roto- por ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling, el cual es un ensayo que revela las células en apoptosis tardía al hacer un marcaje de las hebras de ADN fragmentado)
- Presencia de células excitables con actividad, determinada por imagenología de Ca^{2+} .

4.6a Incubación con calceína-AM

La viabilidad de las rebanadas se probó cargando por medio de la tinción con calceína-AM. Se incubaron las rebanadas en distintos tiempos a lo largo del cultivo por 20 min a 37°C en una solución de medio de cultivo con calceína-AM 1 mM preparada previamente según las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se observan al microscopio de epifluorescencia.

4.6b Imagenología de calcio

Con el propósito de registrar la actividad de múltiples células simultáneamente, utilizamos la técnica de imagenología de calcio *in vitro*. Para implementar esta técnica incubamos un fluoróforo en las rebanadas de cerebro mantenida en líquido cerebrospinal artificial (LCEA). Este fluoróforo es un compuesto que emite luz en la presencia del calcio, por lo tanto, podemos detectar cambios en la concentración intracelular de calcio. Estos cambios ocurren durante potenciales de acción. Sin embargo, para detectar estos cambios las células deben disparar ráfagas o trenes de potenciales de acción debido a que la resolución temporal para adquirir imágenes y el tiempo de respuesta del fluoróforo, son menores que el orden temporal de un potencial de acción único, por ejemplo, durante los estados activos de las neuronas espinosas del estriado (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Además, este tipo de registros permite diferenciar condiciones patológicas (Jáidar *et al.*, 2010; Pérez-Ortega *et*

al., 2016) y medir acciones farmacológicas en condiciones patológicas (Aparicio-Juárez et al., 2019; Lara-González et al., 2019; Plata et al., 2013).

Adquisición de los videos

Las rebanadas de rata se obtuvieron con un corte sagital con vibratomo y se analizaron después de al menos dos semanas en cultivo. Para los experimentos de imagenología de calcio, se mantuvo en LCEA (NaCl 126 mM, dextrosa 15 mM, NaHCO₃ 26 mM, tiourea 0.2 mM, ácido ascórbico 0.2 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM y CaCl₂ 2 mM; pH = 7.4; 300 ± 5 mOsm/L). Posteriormente se incubó durante 25 minutos con el fluoróforo (Fluo 4 AM 1-10 µM, DMSO al 0.1%, ácido plurónico al 0.67%) en solución LCEA con perfusión sostenida de carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂). Posteriormente, se lavó el fluoróforo excedente de la rebanada y se sujetó en el objetivo del microscopio (Olympus XLUMPLFN Objective 20X) para grabar en un campo de 750 x 750 µm en el estriado dorsal. Se grabaron al menos 5 minutos de actividad espontánea para cada condición a una tasa de 8 ± 4 fotos por segundo (fps).

Los experimentos en rebanada de cultivo organotípico realizados fueron: disminuido en Da (es decir, la rebanada en cultivo después de al menos una semana), posteriormente se agregó el agonista dopaminérgico de los receptores tipo D2, pramipexol (10 µM) aplicado en la perfusión y 5 minutos después de que llegó a la rebanada se registró la condición (+pramipexol). En otro experimento se registró actividad espontánea de las rebanadas con el trasplante de neuronas dopaminérgicas (+NDa) sembradas con hidrogel y Sema3C. Al final de cada experimento se agregó alta concentración de KCl para verificar la viabilidad de la rebanada provocando una fluorescencia simultánea en todas las células viables.

Análisis de datos de imagenología de calcio

Detección de transitorios de calcio

Los videos se inspeccionaron visualmente con el programa Im-Patch© (<http://Impatch.ifc.unam.mx>) para identificar coordenadas de regiones de interés correspondientes a las células activas, es decir, con cambios de fluorescencia. Los incrementos rápidos de fluorescencia son una medida indirecta de disparo neuronal, como el fluoróforo es sensible al calcio, la fluorescencia aumenta con el incremento de calcio intracelular, esto es, durante el disparo neuronal (Carrillo-Reid et al., 2008). Posterior al aumento de fluorescencia, esta decae y en casos de neuronas el decaimiento es significativamente más lento que el aumento. El resto del análisis se hace en código desarrollado en FinderSpiker (<https://github.com/vladscrip/FinderSpiker>) en MATLAB (Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.), en donde se detecta la actividad en cada región y mediante un algoritmo de deconvolución (optimización y regularización) se extrae la actividad asociada a disparo neuronal y se representa en una matriz binaria, cuyos

renglones representan las células identificadas, las columnas los tiempos de muestreo del video y con un valor '1' representa actividad detectada para cada célula, esto es, en los tiempos de subida de los transitorios de calcio; '0' para los demás tiempos. Entonces hay una matriz de actividad para condición experimental y es la información representativa del experimento y ilustrada en gráficas tipo *raster* de la actividad simultánea de múltiples células.

Cuantificación de actividad neuronal

Evaluamos la cantidad de actividad registrada. La cantidad de células activas es el primer indicador de cantidad de actividad. Obtenemos la distribución de tasa de transitorios por minuto de cada célula y sus valores promedios de estas distribuciones pueden mostrar cambios entre condiciones. Además de la matriz de actividad, se obtiene una distribución de porcentaje de tiempo con actividad como el cociente entre el número de columnas con actividad y el total de columnas en cada célula. Posteriormente, graficamos las funciones de distribución acumulada (FDA) del porcentaje de actividad de todas las células registradas. Además, se obtuvieron los valores promedio por experimento de porcentaje de tiempo con actividad y tasa de transitorios de calcio por minuto.

Ensamblajes Neuronales

Con el fin de detectar patrones de actividad poblacional detectamos grupos similares de neuronas activas simultáneamente o coactivas a los cuales denominamos ensamblajes neuronales siguiendo el concepto de estudios previos (Carrillo-Reid et al., 2008; Pérez-Ortega et al., 2016). Para esto, se utilizó un algoritmo de agrupamiento jerárquico de la similitud entre conjuntos de células activas simultáneamente, o columnas de la matriz de actividad, por medio de la distancia de Hamming. El primer paso es estimar el umbral de coactividad significativa mediante simulaciones Monte Carlo (N=1000) para descartar que la coactividad sea reproducida por azar. Además, experimentos *in vivo* muestran actividad simultánea de neuronas estriatales durante los movimientos (Kravitz et al., 2010). El umbral de significancia se tomó con $p < 0.05$, esto es, en al menos el 95 % de matrices simuladas, permutando temporalmente los intervalos inter transitorios de calcio, el número máximo de neuronas activas simultáneamente no superó el umbral. El número de ensamblajes se obtuvo desde 2 ensamblajes hasta que un ensamblaje sea redundante, es decir, que se compongan por las mismas neuronas en más de un 75%.

Una vez identificados los ensamblajes neuronales podemos extraer características como tasa de ensamblajes por minuto. Además, medimos el índice de dominancia como el producto entre el porcentaje de células activas pertenecientes al ensamblaje y el porcentaje de tiempo activo. Para cada condición detectamos el ensamblaje dominante máximo como el índice máximo de dominancia. Previamente se había descrito este patrón de un grupo dominante

en el microcircuito en modelo disminuido de Da en rata y ratón, y su desactivación por medio de fármacos dopaminérgicos o estímulos corticales (Aparicio-Juárez *et al.*, 2019; Lara-González *et al.*, 2019; Plata *et al.*, 2013).

Estadística descriptiva

Se utilizó la paquetería *Statistic and Machine Learning* de MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States) para las pruebas estadísticas tomando como valor significativo $p < 0.05$. Para comparar los experimentos con dos condiciones pareadas la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon de una cola. Para dos condiciones no pareadas se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. La prueba de Kruskal-Wallis ANOVA se utilizó para comparar las tres condiciones y test post hoc Tukey-Kramer para múltiples comparaciones. Para comparar funciones de distribución acumulada (FDA) se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov (K-S) con valor p corregido con estimación de la tasa de descubrimiento de falsos positivos para múltiples condiciones de Benjamini and Hochberg.

4.6c Ensayo de TUNEL

La prueba se realizó sobre tejido previamente fijado en PFA al 4% durante al menos 2 h. Seguido a esto se lavó tres veces el tejido en PBS, se dejó permeabilizando toda la noche en tritón al 0.5%. El bloqueo del tejido se hizo incubándolo por una hora en una solución de BSA al 20%. Posteriormente se lavó nuevamente el tejido 2 veces y se incubó durante 1 h a 37°C con la solución de marcaje y la enzima (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR RED, Roche). Finalmente se hizo un lavado en PBS y se observó al microscopio o bien se realizó la inmunofluorescencia como se describió previamente, pero sin bloqueo ni permeabilización adicional.

4.7- Trasplante de Neuronas Dopaminérgicas Maduras

El trasplante se realizó a los ≈40 días de maduración de las neuronas dopaminérgicas. Se depositó 1 μ l con 100 mil células en cada rebanada (lo más cercano a la SN). Se esperó a que las células se adhirieran (≈ 15 min) tras lo cual se depositó 1.5 μ l de hidrogel PuraMatrix (al 0.15% en H₂O mili-Q) solo, o bien con Sema3C (200 μ M) en el estriado y fascículo medio. Los respectivos análisis se realizaron diez días después del trasplante.

4.8- Registros electrofisiológicos

Los registros por *patch clamp* se realizaron en las células sembradas en cubre-objetos en pozos de 35 mm tratados como se especificó previamente, o sobre células trasplantadas a los 40 días de maduración (es decir de 50 días, 10 días después del trasplante). Los cubre-

objetos/rebanadas se depositan sobre una cámara con perfusión continua de solución salina (NaCl 124 mM, KCl 2.5 mM; MgCl₂ 1.3 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucosa 10 mM, ácido ascórbico 0.2 mM y tiourea 0.2 mM, saturado con 95% O₂ y 5% CO₂ 298 mOsm/l) bajo un microscopio de inmersión con un objetivo 40X. Las micropipetas empleadas se hacen con tubos de borosilicato, de un diámetro de 1.5 mm, con una resistencia final de 4-6Ω al rellenarse con una solución interna salina (KSO₃CH₄ 120 mM, NaCl 10 mM, EGTA 10 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, ATP-M 2 mM y GTP-Na 0.3 mM a un pH de 7.3, con osmolaridad de 290 mOsm/l). Se registraron curvas IV en voltage y current clamp (corriente zero) por medio de *patch clamp whole cell*. Los datos se procesaron en el programa mencionado anteriormente Im-Patch.

4.9- Ensayo de crecimiento axonal

Se prepararon las cajas (FluoroDish™, FD5040-100) con PLO durante una noche. Tras un lavado con PBS, se colocaron las cámaras de crecimiento axonal Xona Microfluidics™, SND900 previamente secadas, presionando ligeramente para crear el sello de los canales. Posteriormente se trató durante una noche con Laminina y Fibronectina (1 µg/ml y 5 µg/ml, respectivamente), colocando la solución en los canales a través de los pozos. Las células se colocaron al día siguiente de la siguiente manera: se retiró la solución de Fibronectina/Laminina e inmediatamente se colocaron 250 000 células resuspendidas en 5 µL en uno de los canales laterales. Tras 20 min de reposo en la incubadora (a 37°C), tiempo durante el cual se adhieren las células, se agregó el resto de medio (100 µl por pozo). En los pozos del canal sin células se colocaron 190 µl de medio con Hidrogel PuraMatrix o bien Hidrogel PuraMatrix + Semaforina3C. El medio se cambió cada dos días de ser necesario, o bien se agregó guardando las proporciones mencionadas con el fin de mantener el flujo (del canal con tratamiento hacia el canal con células).

Resumen de métodos

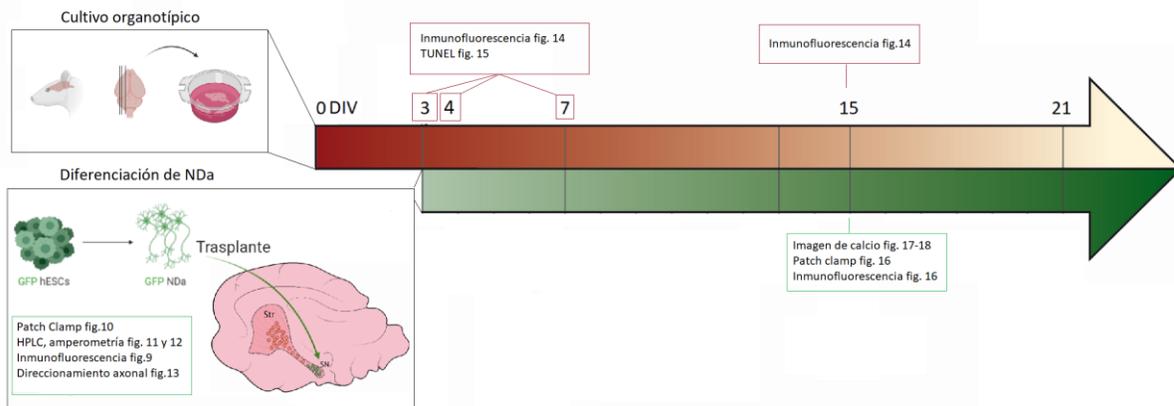


Figura 7. Resumen del esquema experimental. En esta figura se muestra en una línea temporal cómo se realizaron los experimentos. En los cuadros de la izquierda se muestra la obtención de rebanadas sagitales que incluyen la vía nigro-estriatal, para el cultivo organotípico; y la diferenciación y trasplante de hESCs en NDa. El tiempo 0 marca la siembra de las rebanadas, mientras que el trasplante se realiza al tercer día en cultivo de estas últimas, tiempo en el cual ya se diferenciaron las NDa y se dejaron madurar hasta el día 35-40. El degradado rojo representa la pérdida de las neuronas TH+ de las SN, mientras que el degradado verde representa la ganancia de inervación por parte de las NDa trasplantadas. En el esquema correspondiente al tercer día se muestra en verde el sitio de trasplante y en rojo el depósito del hidrogel+Sema3C. Se muestran en recuadros los experimentos realizados (en rojo relacionados al cultivo organotípico y en verde al cultivo con trasplante) correspondiente al día señalado, así como la figura en la cual se muestran los resultados.

5- Resultados

1.1- Diferenciación de células troncales embrionarias H9 GFP a neuronas dopaminérgicas

La línea celular de hESCs H9-GFP se diferenció durante 21 días según el protocolo propuesto por Kriks *et al.* en 2011 para posteriormente dejar madurar las células. Se tomaron fotos en campo claro a lo largo de la diferenciación, donde se pueden apreciar los cambios morfológicos. Se inició con células de nucleolos prominentes, una alta relación de núcleo con respecto al citoplasma y formación de colonias (Thompson *et al.*, 1998), hasta llegar a células con proyecciones y morfología neuronal al cabo de la diferenciación. En la siguiente figura se pueden apreciar dichos cambios morfológicos a lo largo del tiempo, notablemente alrededor del día 12, momento del protocolo en el cual ya se tienen progenitores neurales. Estos progenitores se dirigen a la maduración de neuronas dopaminérgicas con la ayuda de factores tróficos como GDNF y BDNF en un medio favorable para el cultivo neuronal (neurobasal+B27, ver métodos). En la Figura 8 se muestran fotos representativas del estado morfológico de las células a lo largo del protocolo de diferenciación.

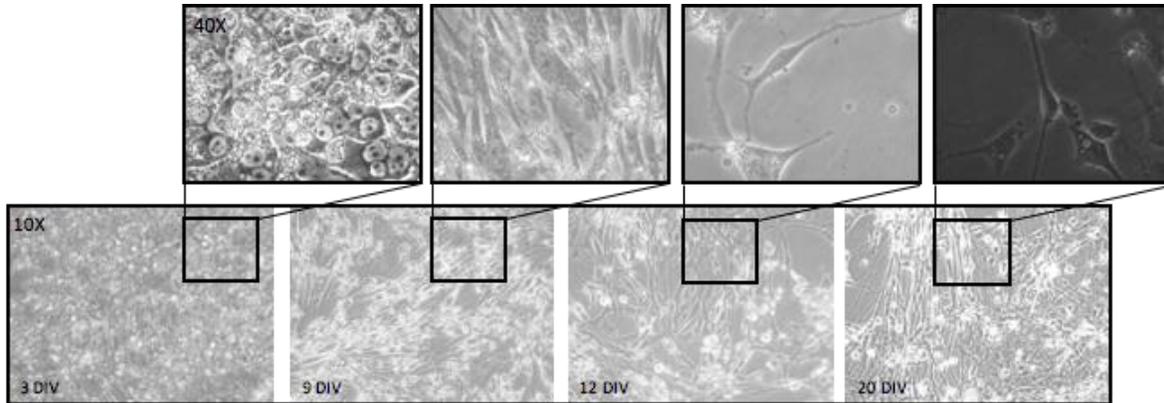


Figura 8. Diferenciación *in vitro* de hESCs a neuronas dopaminérgicas. Imágenes en campo claro que muestran las características del cultivo y morfología de la línea celular de ESCs humanas H9 GFP a lo largo del protocolo de diferenciación: 3, 9, 12 y 20 días *in vitro* (DIV). Imágenes del recuadro superior en 40X, del panel inferior 10X.

1.2- Caracterización de neuronas dopaminérgicas

1.2a Inmunofluorescencia para neuronas de 50 días de maduración

La caracterización de las células ya se ha realizado anteriormente, tanto en el protocolo original, como en los trabajos realizados en el laboratorio (Carballo-Molina *et al.*, 2016). Es decir, se ha reportado pérdida de marcas de pluripotencia (OCT4, SOX2) a lo largo de la diferenciación, así como ganancia de marcas de neuronas y en particular neuronas dopaminérgicas (LMX1a, TH, GIRK2). Por esta razón se realizó la caracterización inmunohistoquímica únicamente en tiempos de maduración largos, como 40, 50 o 60 días. Los marcadores empleados confirman la presencia de neuronas (TUJ1), dopaminérgicas (PITX3), maduras (GIRK2, TH, MAP2, NRP1). En la Figura 9 se muestran únicamente algunos de los marcadores mencionados en el día 50 y sus respectivas cuantificaciones.

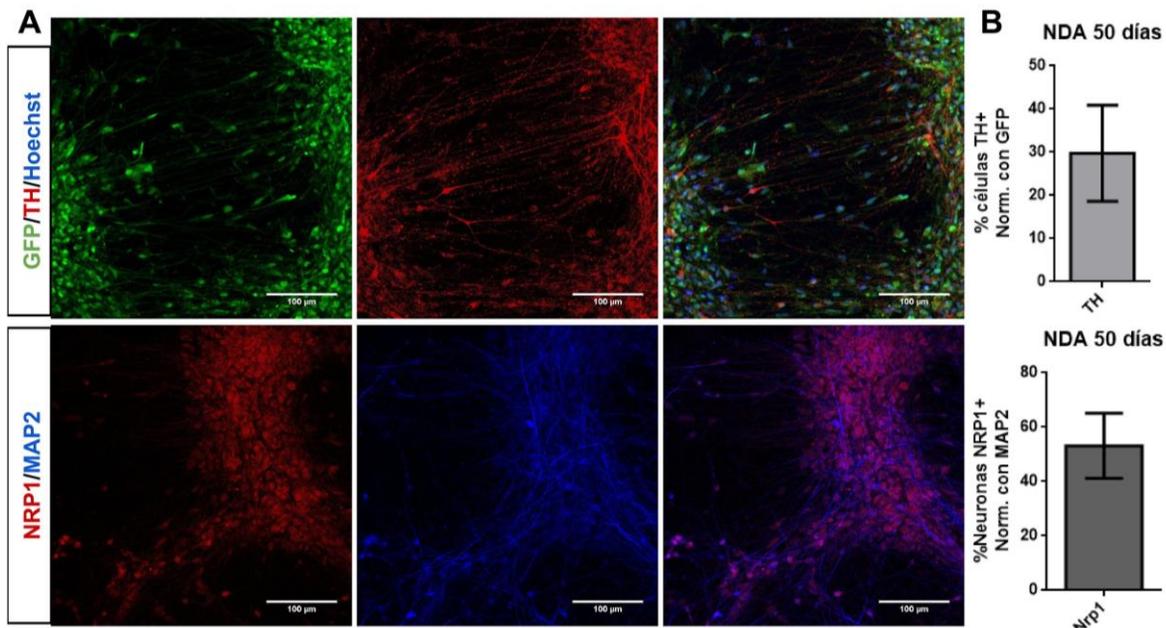


Figura 9. Caracterización inmunohistoquímica de NDA a los 50 días de maduración *in vitro*. A) Inmunofluorescencia contra TH, Tirosina hidroxilasa; Map2, proteína asociada a microtúbulos 2; Nrp1, Neuropilina 1, la barra de escala corresponde a 100 μ m. B) Cuantificación de TH y Nrp1; promedios del histograma de color obtenido para cada canal de al menos 6 campos, promedio \pm SD.

En la Figura 9 se muestran por inmunofluorescencia las marcas de TH, MAP2 y Nrp1, además de la GFP, en cultivos de 50 días. En la parte superior derecha se muestra un porcentaje del 30% de células TH+ con respecto al total, relacionado a la expresión constitutiva de GFP. También se observa alrededor del 50% de células positivas al receptor de Semaforinas Nrp1 (inferior derecha), con respecto al total de neuronas maduras, indicado por marca de MAP2. Esto nos indica que las células al día 50 contienen neuronas maduras TH+ con la capacidad de responder al estímulo con Sema3C. Para confirmar esta capacidad se sometieron a una prueba de crecimiento axonal en cámaras de microfluído con microcanales axonales (ver sección 1.3 de resultados).

1.2b Caracterización electrofisiológica por *patch clamp*

Para medir las propiedades electrofisiológicas de las neuronas diferenciadas, se realizaron registros de corriente y voltaje por medio de la técnica de *patch clamp whole cell*. Como se muestra en la Figura 10, los registros se tomaron a lo largo del tiempo de maduración (20-60 días) con el fin de apreciar el período en el cual las células expresan los canales iónicos necesarios para producir potenciales de acción, así como algunas de las respuestas electrofisiológicas características de las NDa.

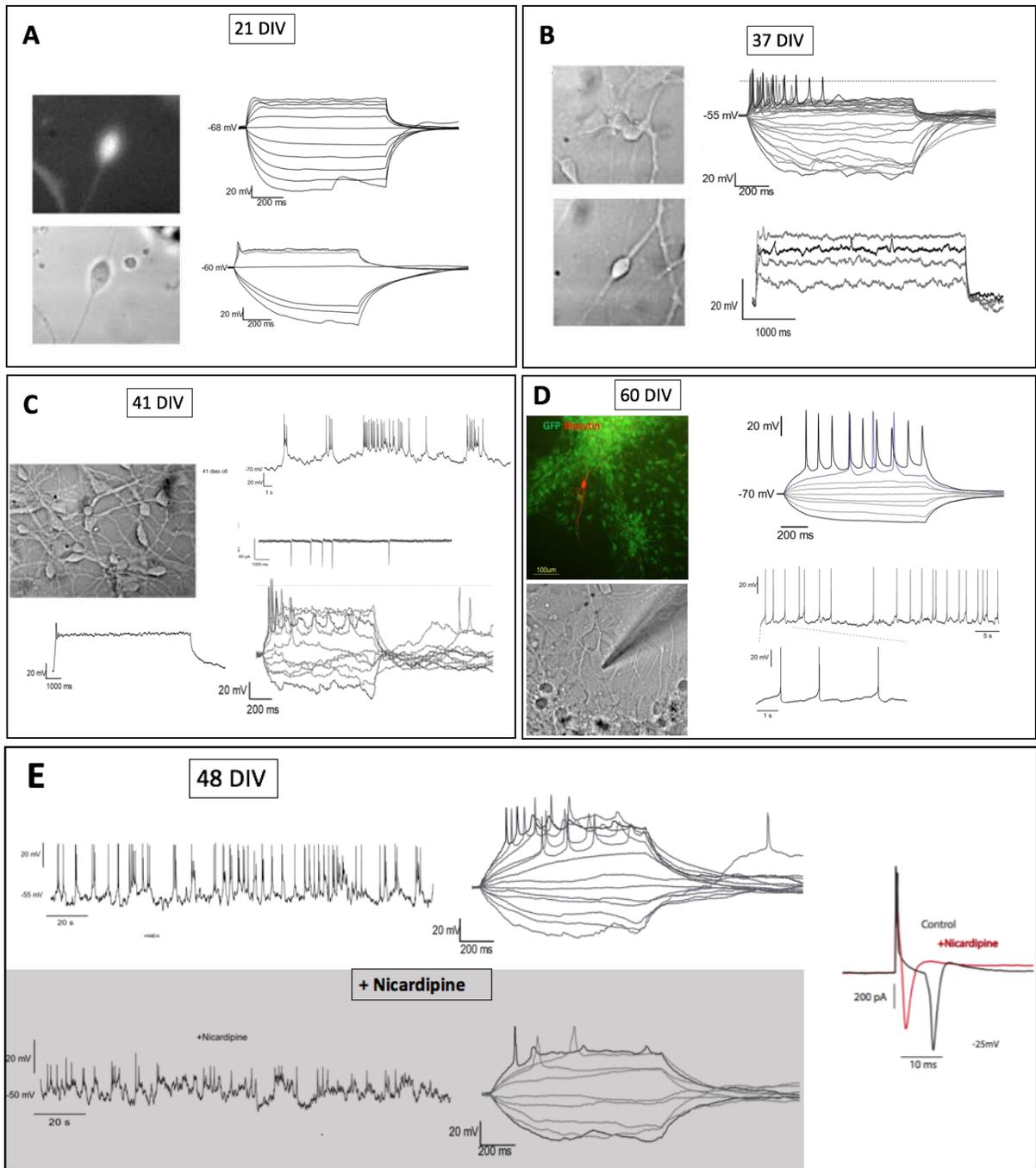


Figura 10. Caracterización electrofisiológica de las NDA a lo largo del tiempo de maduración *in vitro*. Registros electrofisiológicos obtenidos por *patch clamp* en *current* y *voltage clamp* (ej. C, en medio). Los registros muestran los cambios en el voltaje de la membrana celular a lo largo del tiempo. Cada trazo corresponde al voltaje tras un pulso cada vez mayor de corriente. Del lado izquierdo se observan en infrarrojo las células registradas a los 21 días (A), 37 días (B), 41 días (C) y 60 días (D). En (A) se muestra igualmente la marca para GFP y en (D) se muestra la pipeta con el sello sobre la célula (abajo izquierda) así como la célula registrada por marca contra Biocitina (arriba izquierda). (E) Tratamiento con nicardipina de una célula activa de 48 días en cultivo. Se muestra la diferencia en las corrientes espontáneas (izquierda, la respuesta a pulsos

de corriente (en medio) y los cambios en un potencial de acción (derecha), n=3. Se registraron >40 células, de las cuales 37% ue excitable.

En la Figura 10 se muestran ejemplos representativos de los registros obtenidos entre los días 21 y 60 de maduración. Las células registradas se visualizaron con biocitina introducida durante el registro electrofisiológico de las neuronas, como se muestra en rojo en el panel D. Durante los primeros días de registro se pudieron observar células GFP+ con características de NDa inmaduras, es decir, cambios ligeros en el voltaje (posiblemente debido a la presencia de corrientes de sodio, corrientes transitorias entrantes que generan *spikes*), bajo el suministro de corrientes despolarizantes, más no se registraron potenciales de acción (A). Al día 37 (B), se pudieron observar los primeros disparos, con una frecuencia baja (similar los 4 Hz de NDa), en células con proyecciones alargadas, además de una respuesta de adaptación a la corriente (canales de potasio). Al día 41 (C) se observaron, además de los potenciales de acción, una respuesta de rebote y el *plateau* característicos de canales de Ca^{2+} . Sin embargo, algunas células dentro del mismo cultivo siguieron sin ser excitables, lo cual habla de un cultivo heterogéneo. Al día 48 (E) se observaron además corrientes espontáneas posiblemente ligadas a las conexiones sinápticas entre las neuronas del cultivo. En este mismo tiempo se realizó una prueba con un inhibidor de canales de Ca^{2+} , la nicardipina. La inhibición permitió observar una disminución de los potenciales de acción, la ausencia de la respuesta de rebote y la inhibición de corrientes espontáneas. Además, se observa cómo disminuye el pico de la corriente L, también característica de canales de Ca^{2+} . Finalmente, a los 60 días de maduración en cultivo (D) se pudieron observar distintas respuestas de corriente ante distintos voltajes, como por ejemplo la posible presencia de canales de Ca^{2+} (familia L anteriormente mencionados), que producen potenciales de altos voltajes, en un inicio, seguido de corrientes que no llegan a provocar el disparo. Esto podría deberse a la presencia de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , provocando una adaptación.

En conjunto, los resultados, sugieren la presencia de neuronas excitables a partir del día 40 de maduración, sin embargo, algunas características como el “sag” -característico de una corriente entrante activada por hiperpolarización (Ih)- parecen seguir ausentes al día 60 de la diferenciación.

1.2c Ensayo de liberación de dopamina por HPLC

Además de la expresión de marcadores de NDa y las propiedades eléctricas, se midió la capacidad de liberación del neurotransmisor Da y sus metabolitos, por medio de HPLC, cromatografía líquida de alta eficacia. Ésto se realizó en células de 60 días en cultivo con un estímulo de una solución con alta concentración de potasio.

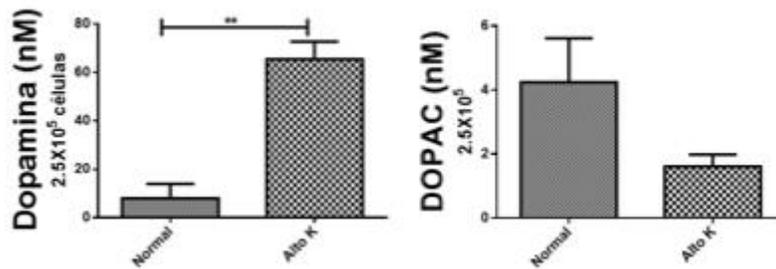


Figura 11. Las NDA maduras tienen la capacidad de liberar dopamina al ser estimuladas. Cuantificación, concentración de dopamina o DOPAC liberada al medio antes (solución normal) y después del estímulo (alto K) con una concentración de KCl 100 mM, promedio \pm SEM, ** $p < 0.005$, t test, $n = 3$.

En la Figura 11 se observa un incremento significativo en los niveles de Da en el medio tras un estímulo con K^+ (100 mM), además de una aparente disminución -aunque no significativa- de DOPAC, uno de los posibles metabolitos de la Da. Este resultado nos habla de la capacidad de las NDA de producir y liberar Da.

Tras la obtención de los resultados anteriores y la falta de potenciales de acción registrados al sembrar células de 21 días en cultivo, se decidió hacer el trasplante de las células en el día 38 ± 2 de cultivo, y los registros o experimentos subsecuentes al menos diez días después del trasplante.

1.2d Medición de liberación catecolaminérgica por amperometría

Al igual que el ensayo por HPLC, este método nos permitió comprobar la liberación catecolaminérgica en nuestros cultivos. A diferencia del HPLC, la amperometría mide en tiempo real los picos de liberación del neurotransmisor en una única célula. Se colocó el electrodo sobre el soma de las células de interés y se registró durante varios minutos. Por este medio se pueden medir distintos parámetros como la amplitud de la espiga registrada, el tiempo medio de duración y, calculando el área bajo la curva, la carga presente en las vesículas. A continuación, se muestran algunos datos preliminares obtenidos para cultivos de ≈ 50 días.

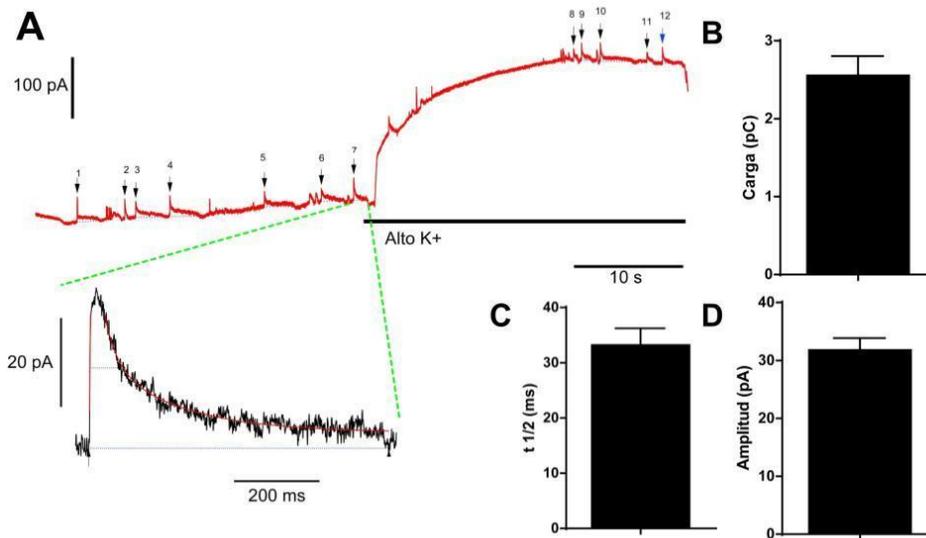


Figura. 12. Liberación somática de catecolaminas de NDa de 50 días en cultivo. A) Registro de corrientes (v-clamp) a lo largo del tiempo antes y después de un estímulo con KCl 100 mM (alto K+). Las flechas con números indican incrementos en la corriente que representan picos de liberación de neurotransmisor. Se muestra la ampliación de uno de los picos, con forma de subida rápida y caída lenta. **B)** Carga de las vesículas medido en pico Coulombs (corriente por segundo) (área bajo la curva). **C)** tiempo de duración del pico de liberación en ms y **D)** amplitud del pico de liberación en pico amperios. Las gráficas muestran la suma de todas las espigas registradas, promedio \pm SD, n=9 de un total de 45 células registradas.

A pesar de que no se observa una diferencia clara en la frecuencia de picos de liberación de catecolaminas al hacer el estímulo con alto potasio, estos fueron detectados en alrededor del 20% de las neuronas registradas (Figura 12). Dichos picos superan en su mayoría los 20 pA, criterio empleado por algunos autores como referencia para considerarse un buen registro, y duran en promedio 30 ms. De esto se pudo medir la carga promedio liberada (probablemente por exocitosis) por las células, del orden de pC, mayor a aquello reportado previamente en registros en SNpc (Jaffe *et al.*, 1998).

1.3- Ensayo de crecimiento axonal de neuronas maduras

Debido a que se optó por usar neuronas con mayor tiempo de maduración para el trasplante, fue necesario probar el direccionamiento axonal en respuesta al estímulo por la Sema3C liberado por el hidrogel. Para esto se contó, al igual que en el artículo publicado por Carballo-Molina en 2016, el número de axones TH+ capaces de cruzar los microcanales de las cámaras de crecimiento axonal de 900 μm en dos diferentes condiciones: con y sin Semaforina 3C. En la Figura 13 se muestran algunas imágenes representativas, así como la cuantificación.

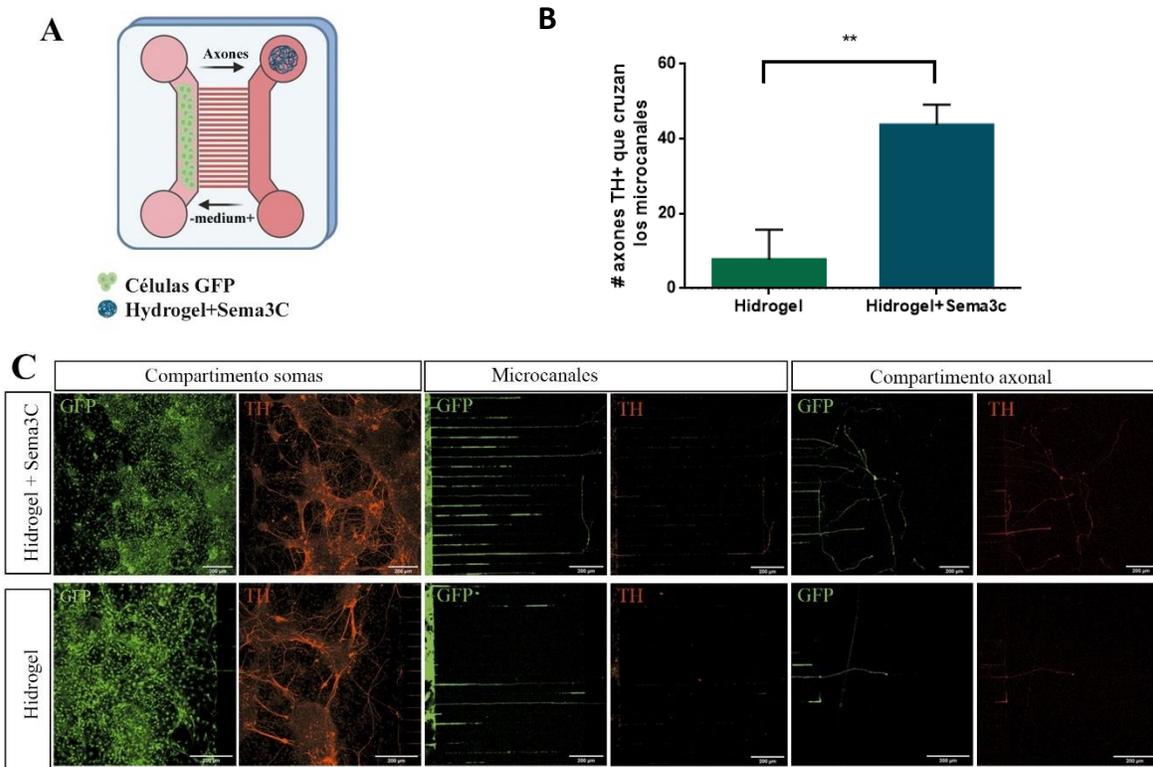


Figura 13. Respuesta axonal de las NDa de 40 DIV ante un estímulo con Sema3C. **A)** Esquema representativo del experimento, cámara de crecimiento axonal de dos canales interconectados por microcanales de 900 μm . Los círculos corresponden a los sitios de depósito de medio, hidrogel y células. Las flechas indican la dirección del flujo, la intensidad de rosa indica mayor volumen. **B-C)** Células de 40 días se sometieron a un estímulo dado por Sema3C liberada por el hidrogel PuraMatrix (Hidrogel+Sema3C), o bien únicamente expuestas al hidrogel. **B)** Cuantificación del número total de axones mayores a 900 μm , es decir capaces de cruzar al compartimento axonal, con marca TH+. Promedio \pm SEM, ** $p < 0.005$, $n = 3$ (prueba t de student con corrección de Welch) **C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencias contra TH y marca de GFP, en neuronas de 50 días sembradas a los 40 días en cámaras de crecimiento axonal. Imágenes del compartimento con los somas (izquierda), de los microcanales axonales (centro) y del compartimento sin células, pero con hidrogel con o

sin Sema3C (derecha). La línea punteada indica el límite entre los microcanales y el compartimento axonal; barra de escala=200 μm .

En la figura anterior podemos observar una densidad similar en ambas condiciones (con y sin Sema3C) de células en el compartimento con los somas, así como marca positiva para TH en ambas condiciones. Sin embargo, en el compartimento de micro canales axonales se observa una cantidad menor de axones cruzando los microcanales en ausencia de Sema3C, consecuente con una menor cantidad de axones del lado del compartimento axonal. Cabe remarcar que la mayoría de los axones mayores a 900 μm son TH+. La cuantificación muestra una diferencia significativa en el número de axones >900 μm en la condición con Sema3C, lo que permite confirmar la respuesta de las NDa maduras ante el estímulo con el atractor.

2.0- Cultivo organotípico como modelo de enfermedad de Parkinson

Con el fin de obtener un modelo de la enfermedad de Parkinson en cultivo organotípico se comprobó, de modo similar a trabajos reportados anteriormente y replicado por Carballo-Molina (ver antecedentes) la pérdida gradual de la vía nigro-estriatal mientras que se confirmó la viabilidad del tejido en general (estructuras como la corteza, hipocampo, estriado). Para el primer punto se realizó una inmunotinción de la rebanada con el anticuerpo para TH a lo largo del tiempo (0, 4 y 14 días en cultivo), y se realizó un conteo celular de NDa en la SN. La Figura 14 muestra inmunotinciones contra TH en rebanadas a lo largo del tiempo.

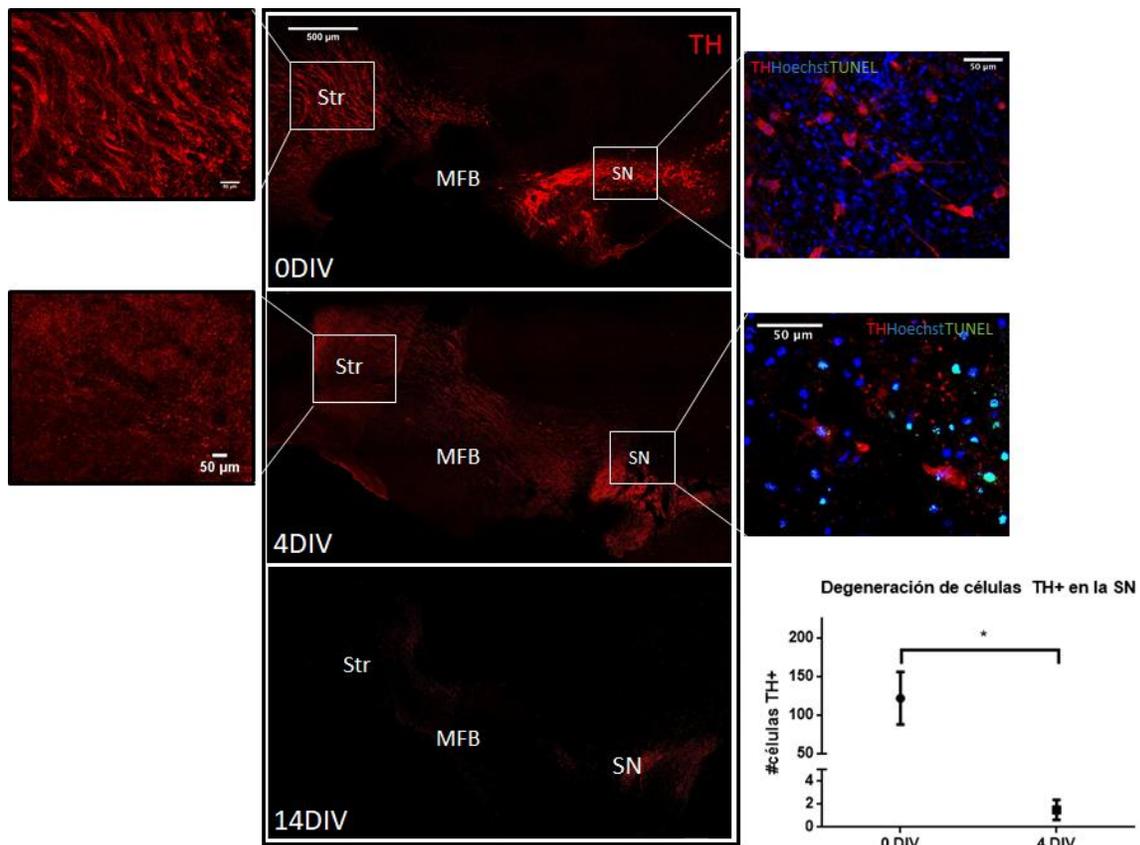


Figura 14. Degeneración de la vía nigro-estriatal durante los primeros días en cultivo. Inmunofluorescencias contra TH en rebanadas de cultivo organotípico a los 0, 4 y 14 días de cultivo. En los acercamientos se muestra la marca para TH en el estriado (izquierda) o en la *substantia nigra*, SN (derecha), barra de escala, 50 μ m y 500 μ m. En esta última se muestra también la marca para la reacción de TUNEL. Abajo a la derecha se muestra la cuantificación del número de células TH+ en SN en rebanadas de 0 y 4 días; a los 14 días no fue posible distinguir somas íntegros de NDa. Promedio \pm SEM * $p < 0.05$ $n = 4$ (prueba t de Student con análisis de corrección de Welch).

En la figura anterior es posible observar neuronas TH+ en la SN en el tiempo 0 de cultivo, es decir, en rebanadas recién obtenidas, a diferencia de los tiempos posteriores. Al día 4 aún es posible localizar algunas células TH+. Sin embargo, la disminución/pérdida es significativa. Asimismo, podemos observar la ausencia de marcaje con la reacción de TUNEL (que indica apoptosis) en la SN al día 0, y la presencia al día 4. A las dos semanas de cultivo no se distinguen somas de NDa en la SNpc, a pesar de que se distingue un ligero marcaje para TH en lo que fuese la vía nigro-estriatal.

2.1- Ensayos de viabilidad y muerte celular en cultivo organotípico

Para confirmar que las rebanadas fueran viables a lo largo del cultivo, se cargaron en distintos tiempos con calceína-AM y también se realizaron ensayos de imagenología de calcio. Además, se realizó un ensayo de TUNEL a distintos tiempos de cultivo con el fin de

descartar la idea de que la pérdida de la vía nigro-estriatal se deba simplemente a una muerte general de la rebanada. Para esto último, se realizó el conteo celular en distintas regiones para determinar el porcentaje de muerte celular, como se muestra en la Figura 15

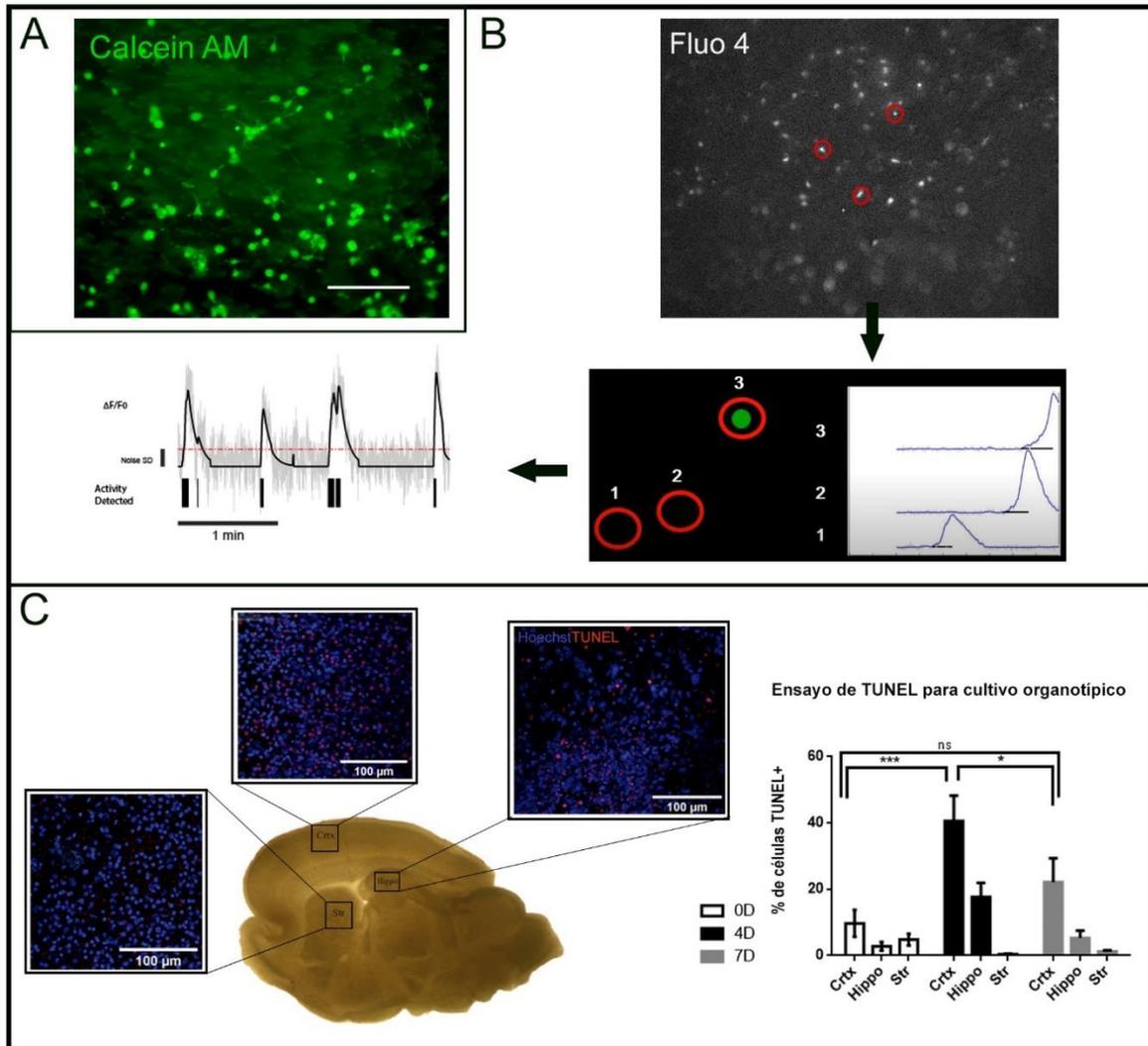


Figura 15. Las rebanadas mantienen la viabilidad a lo largo del tiempo de cultivo. A) Imagen tomada en la región del estriado al microscopio de epifluorescencia de rebanada cargada con calceína-AM a los 18 días de cultivo organotípico, barra de escala 100 μ m. **B)** Imagen tomada con epifluorescencia que muestra la señal de Fluo4 a los 15 días. Se marcan con círculos algunas regiones de interés (ROI) correspondientes a células cargadas con el fluoróforo. Seguido a esto, al medir los incrementos en la fluorescencia a lo largo del tiempo (representados como picos) se detectan los transitorios de calcio, que también pueden representarse como rectángulos negros (B abajo izquierda). **C)** Esquema representativo del experimento en donde se muestra una rebanada, inmunofluorescencia para la reacción de TUNEL en rojo y los núcleos en azul. Cuantificación para células TUNEL+ en distintas regiones a los 0, 4 y 7 días de cultivo. Crtx, Corteza; Str, estriado; Hippo, hipocampo. * $p < 0.05$ *** $p < 0.0005$, $n = 3$ (Anova de dos vías con prueba de Tukey de comparaciones múltiples).

En la figura 15 se muestra una imagen representativa de una rebanada (18 días, región del estriado) cargada con calceína-AM en donde se pueden observar células fluorescentes con morfología neuronal. Por su parte, en el inciso B podemos ver un campo del estriado de una rebanada de 15 días en cultivo (los videos se tomaron en corteza, hipocampo y estriado, en rebanadas de hasta 21 días en cultivo, no mostrado), estimulado con una solución de alto KCl. Los puntos fluorescentes corresponden a células excitables en las cuales el KCl produjo una elevación en los niveles de calcio intracelular, marcado con el fluoróforo Fluo-4, lo cual confirma la viabilidad del tejido. En breve, y como se explicó en los métodos, se detectan los incrementos transitorios en el calcio intracelular, traducidos como incrementos rápidos y decaimientos lentos en la fluorescencia. Estos se representan como 1 en una matriz, o como puntos negros durante todos los *frames* (un frame corresponde a una imagen del video) que dure el incremento, y se representan en un mapa que grafica actividad celular a lo largo del tiempo, llamado *raster* (ver sección 3.2).

Finalmente, en la Figura 15C se muestra un esquema representativo del experimento, en donde se analizaron por conteo celular distintas regiones de la rebanada, como hipocampo, corteza y estriado (izquierda), y la cuantificación resultante (derecha). Ésta muestra un incremento significativo en el número de células apoptóticas únicamente en la corteza a los 4 días de cultivo, cuando el porcentaje alcanza alrededor del 40%. Posteriormente (día 7) el número de células en apoptosis disminuye de manera significativa en la corteza, a pesar de mantener un 25%. A pesar de ser una cifra elevada, cabe mencionar que la marca representa las capas más superficiales de tejido, mismas que son las primeras en morir en los cultivos organotípicos. Otras regiones como el estriado e hipocampo presentan un ligero incremento no significativo al día 4. Estos resultados indican que la rebanada en cultivo se mantiene viable a lo largo del tiempo, y que la muerte celular de neuronas dopaminérgicas es específica.

3.0- Trasplante de NDa maduras sobre el tejido parkinsoniano de cultivo organotípico

3.1 Registro electrofisiológico de células trasplantadas

Una vez que se caracterizó la identidad y madurez dopaminérgica de las células diferenciadas y se reafirmó el cultivo organotípico como modelo de la PD, se realizó el trasplante celular con NDa, diferenciadas 28-30 días, en la SN. Éste se hizo al tercer día del cultivo organotípico, posterior a lo cual se intentó registrar las NDa por medio de *patch clamp*. A pesar de la dificultad para realizar el sello entre la membrana celular y la pipeta, se logró registrar una célula con potenciales de acción, que se muestra en la Figura 16.

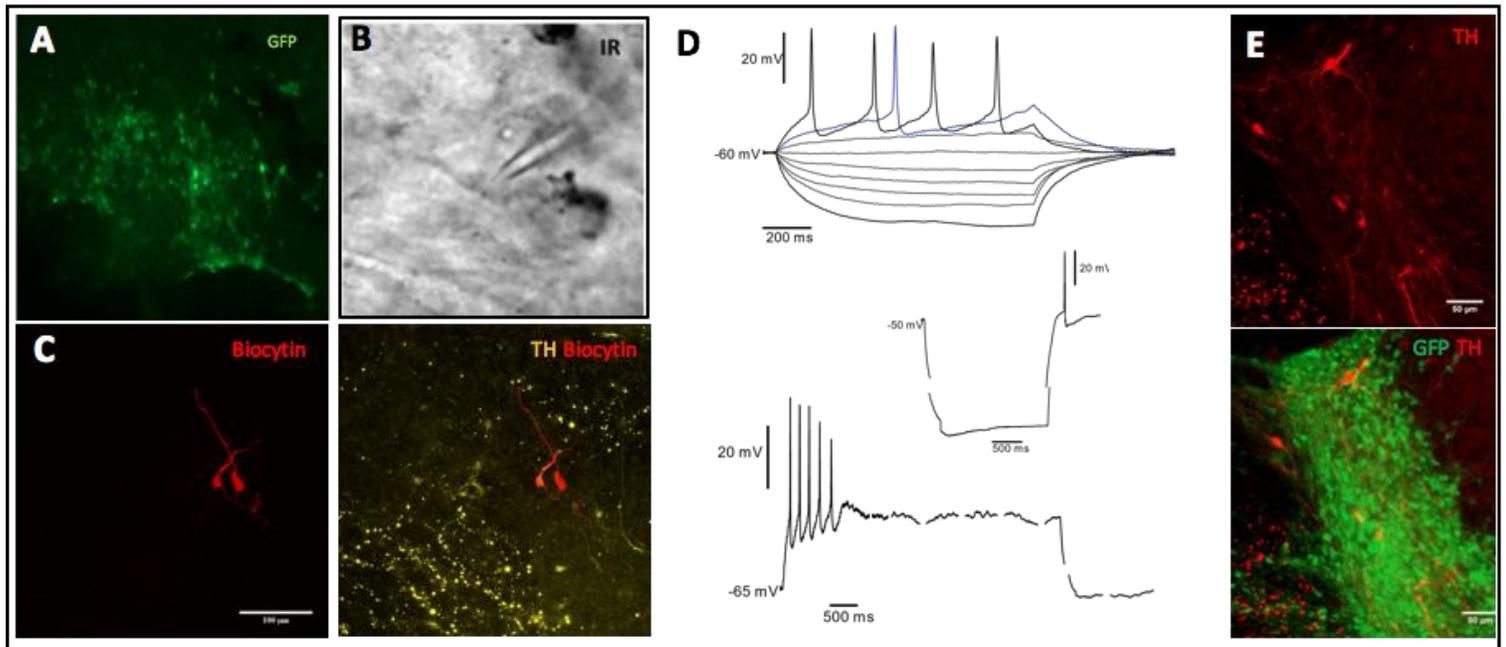


Figura 16. Las células trasplantadas presentan propiedades eléctricas en la rebanada organotípica, después de diez días del trasplante. **A)** Imagen del trasplante GFP+ sobre la rebanada al momento de hacer el registro electrofisiológico (10 días después de hacer el trasplante sobre la rebanada). **B)** Neurona sellada por *patch clamp* vista con infrarrojo (IR). **C)** Misma célula registrada tras la tinción contra biocitina y TH, y **D)** el registro de sus potenciales de acción inducidos por pasos despolarizantes e hiperpolarizantes, respuesta de rebote y burst/plateau. En **E)** se observa la presencia de neuronas TH+ en un trasplante. Barra de escala en **C)** 100 μm y 50 μm en **E)**. El registro corresponde a una única célula.

En la Figura 16 se observa el trasplante de NDA sobre una rebanada de dos semanas en cultivo, el cual queda restringido a la región de depósito (SN) y presenta neuronas TH+ (rebanadas diferentes en A y E). La célula a la cual se le hizo *patch clamp whole cell* resultó ser dopaminérgica como lo indica la marca positiva para TH. Ésta presentó potenciales de acción al inyectar corriente (current clamp; parte superior), así como otras respuestas presentes en NDA como el disparo en ráfagas (parte inferior).

3.2- Análisis de microcircuitos neuronales en el estriado de cultivos organotípicos

Una vez sabiendo que los cultivos organotípicos son viables a lo largo del tiempo en cultivo, y que las neuronas trasplantadas presentan respuestas electrofisiológicas, se decidió analizar la actividad en el estriado, el cual se caracteriza por presentar poca actividad en rebanadas agudas de animales sanos, y por presentar patrones de actividad de microcircuitos. En particular, se ha relacionado un tejido sano con patrones de actividad reverberante, es decir, con ciclicidad en la actividad entre distintos grupos neuronales al

activar el tejido con NMDA. Además, por la relación que tiene el estriado con el movimiento y con la PD, se han hecho análisis en donde se muestran cambios en la actividad estriatal, siendo esta mucho mayor y con un patrón de actividad distinto, que pierde la reverberancia entre grupos y adquiere un grupo de neuronas con actividad dominante. Por ésto, se tomaron videos de dichos microcircuitos en las rebanadas a las dos semanas en cultivo, tiempo en el cual la vía nigro-estriatal endógena ya se ha perdido y tiempo en el cual se hacen los registros en rebanadas con trasplante.

En la Figura 17 se muestra una comparación, representada en gráficas tipo *raster*, entre una rebanada de cultivo organotípico de 15 días, antes y después de agregar el agonista dopaminérgico pramipexole al baño de perfusión (A), y una rebanada de 15 días a la cual se le hizo un trasplante de NDAs al tercer día (B).

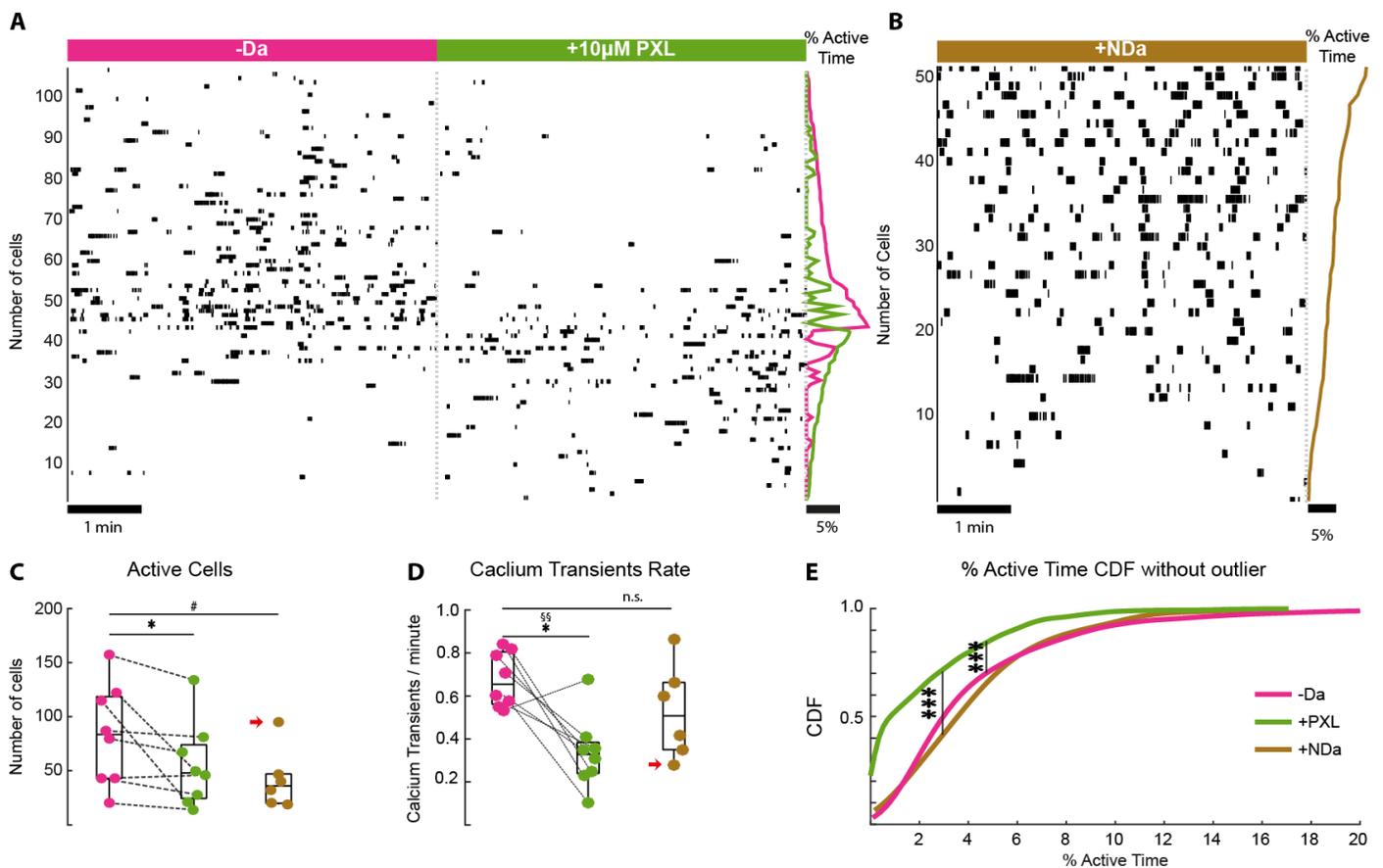


Figura 17. Actividad parkinsoniana en el estriado de cultivos organotípicos y recuperación con la administración de un agonista D2. Las gráficas muestran la cuantificación de la actividad neuronal de experimentos representativos en rebanadas con disminución de dopamina debido a la pérdida de la vía nigro-estriatal (-DA, en rosa), el efecto de pramipexol (PXL, verde) en la misma rebanada, y de rebanada con disminución de dopamina y el efecto del trasplante de NDa (+NDa, café) **A)** Actividad neuronal espontánea grabada por 5 min por condición. El panel derecho muestra el porcentaje de tiempo con actividad por célula, con escala de 5%. **B)** Actividad espontánea en rebanada con trasplante, 10 min de grabación. Para **C-E)** se hicieron los análisis sin tomar en cuenta el punto señalado con una flecha roja. **C)** Reducción en el número de

células activas con pramipexol respecto a la actividad espontánea previa a la administración del fármaco. Se aprecia disminución significativa en el número de células activas con pramipexol $p=0.010353$, y con trasplante $p=0.019937$. **D)** Promedio de transitorios de calcio por minuto en cada experimento. Se observa una mayor tasa de transitorios de calcio en la rebanada -DA que en -DA + pramipexol $p=0.010431$, pero no + NDa, $p=0.25503$. Kruskal Wallis ANOVA muestra que hay diferencia para múltiples comparaciones de los 3 grupos $\chi^2(2) = 9.68$, $p=0.0079$. Post hoc Tukey-Kramer muestra la diferencia entre: DA-depleted vs DA-depleted + pramipexol $p=0.0070922$ únicamente. **E)** Funciones de Distribución Acumuladas (CDF) del porcentaje de tiempo con actividad. -DA vs + PXL, K-S $D= 0.4445$, $p<0.001$. Sin diferencia significativa entre -DA y -DA + NDa, $p=0.050911$. Con diferencia significativa entre +PXL vs +NDa, $p<0.001$.

En la figura anterior se puede observar que la actividad neuronal espontánea de la rebanada en cultivo organotípico muestra características similares a las reportadas en rata y ratón lesionados *in vivo* con 6-OHDA. Estas características son: hiperactividad espontánea y presencia de un grupo dominante, esto es, un grupo similar de neuronas que es conformado por la mayoría de neuronas y es altamente recurrente (Jáidar *et al.*, 2010) y la reducción de la actividad y desaparición del ensamble dominante en presencia de un agonista dopaminérgico como el pramipexol (Lara-González *et al.*, 2019).

Se observa también que el agonista dopaminérgico redujo de manera significativa la cantidad de neuronas activas, la tasa de transitorios de calcio promedio y el porcentaje de tiempo activo en la rebanada disminuida de DA de manera similar a otros experimentos extraídos de ratones modelo hemiparkinsonianos. En el caso de las rebanadas con trasplante (+NDa) se pudo observar una disminución del número de células activas (Fig. 17C), no obstante, estas mantienen una alta actividad espontánea (Fig. 17B), lo que explica que no se vea un cambio significativo en D y E entre la condición -Da y +NDa. Para estudiar las interacciones entre las células del estriado, se hizo un análisis de ensambles neuronales con los datos obtenidos, representado en la Figura 18.

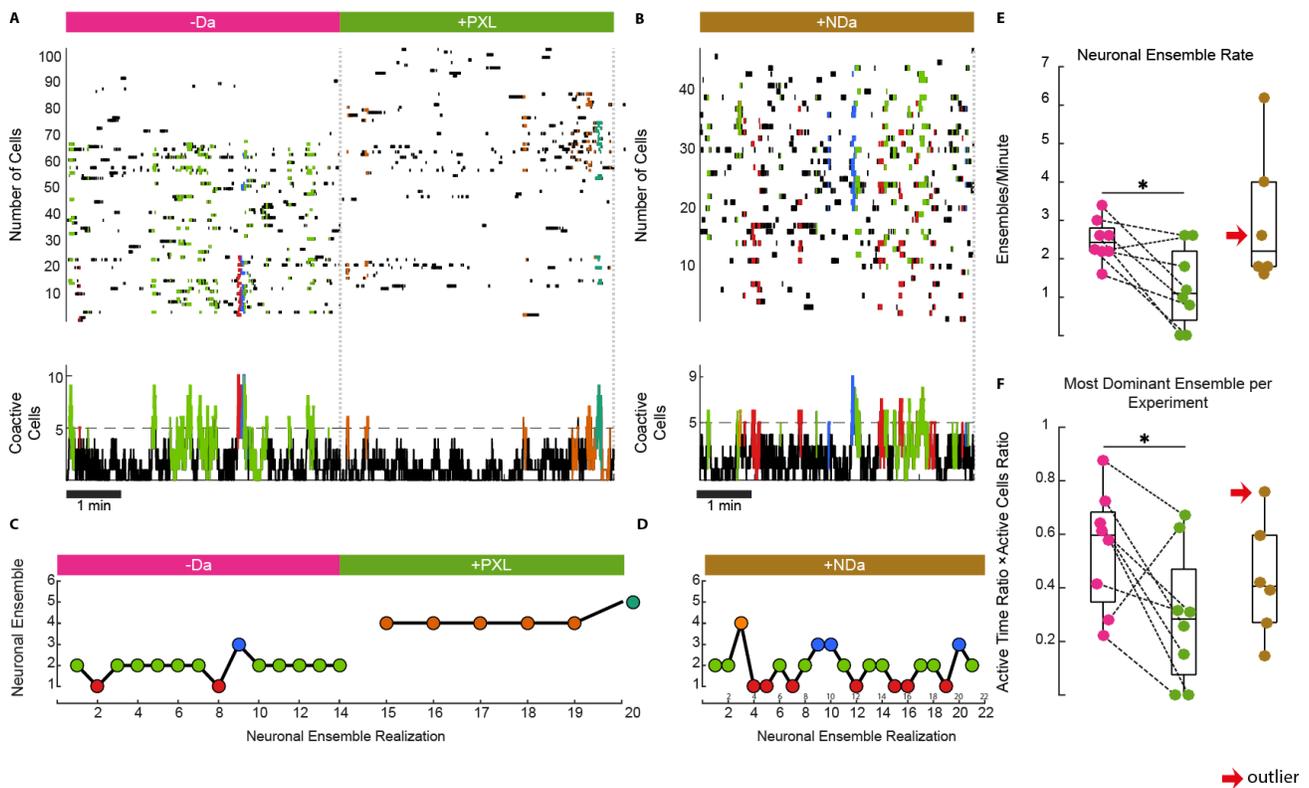


Figura 18. Ensamblas neuronales detectados en rebanadas de cultivo organotípico y su modificación por pramipexol y el trasplante de NDa. **A.** Experimento representativo con ensamblas neuronales durante la actividad espontánea en la condición disminuida de dopamina (-Da), con pramipexol y **B)** con trasplante. Gráfica superior: matriz de actividad neuronal (*raster*), donde cada color representa un grupo de neuronas activadas simultáneamente o ensamble neuronal, detectado para ambas condiciones. En negro, la actividad que no pertenece a ningún ensamble. Gráfica inferior, señal de coactividad o suma vertical de la matriz de actividad. La línea punteada representa el umbral de coactividad. **B)** Experimento representativo con ensamblas neuronales en la rebanada -Da + NDa. **C)** Secuencias de ensamblas neuronales del experimento mostrado en **A.** Cada círculo representa activación de un ensamble a lo largo del tiempo. Se obtienen de las columnas en color de la matriz de actividad y se sitúan en el tiempo correspondiente al pico de coactividad del ensamble. Están organizados en niveles o renglones. **D)** Secuencia de ensamblas del experimento mostrado en **B.** **E)** Tasa de ensamblas por minuto. Hay una disminución de tasa de ensamblas debido a pramipexol ($p=0.014586$). Y no observada con en +Nda respecto a -Da ($p=0.44149$) **F)** Ensamblas dominantes por experimento. Para cada experimento se extrajo el producto máximo entre porción de neuronas que participan y porción de tiempo activo del ensamble en cada condición experimental. El ensamble mayormente dominante en la rebanada -Da es reducido por + pramipexol ($p=0.040029$). Entre -Da y +Nda la diferencia no es significativa ($p=0.082165$).

En la figura anterior se pudo observar en C cambios en los patrones de actividad entre las tres condiciones (-Da, +PXL y +NDa). En el caso de -Da, se observa un grupo de neuronas con alta actividad dominante (verde) y al adicionar pramipexol dicha actividad desaparece y se percibe actividad (aunque menor) de otro grupo celular (naranja). Esto se ve reflejado en la tasa de ensamblas neuronales ϵ y en la dominancia de un ensamble (F). En el caso de la condición +NDa, a pesar de que no se observa una disminución de ensamblas neuronales

ni una diferencia significativa en la aparición del ensamble dominante (E y F), se observa una mayor alternancia entre grupos (D). En resumen, aunque no haya disminuido la hiperactividad espontánea, estas rebanadas presentan algunas características de ambas condiciones.

6- Discusión

El uso de ESC como tratamiento de enfermedades degenerativas ha abierto una gran cantidad de propuestas en el campo de la medicina regenerativa, entre las cuales se encuentra el trasplante de NDa humanas diferenciadas como tratamiento para la PD. No obstante, el contexto de esta enfermedad y de los trasplantes en general es complejo y necesita de una estrategia adecuada para la obtención de resultados positivos, lo que implica el uso de diversos factores que mejoren la supervivencia, adecuación, integración, eficiencia, etc. del trasplante.

Algunos de estas variables se han estudiado en distintos trabajos, entre los cuales se encuentra la viabilidad del trasplante. En efecto, se ha propuesto el uso o expresión de factores tróficos como BDNF o GDNF y hormonas como la Eritropoyetina (Simorgh *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2019) por el efecto positivo que tienen en cultivos de células fetales de mesencéfalo y por la disminución de estos en el ambiente neurodegenerativo de una enfermedad. Se han empleado igualmente agentes anti-apoptóticos y anti-oxidantes como los lazaroides.

Otro método para incrementar la supervivencia de los trasplantes ha sido el co-cultivo con otros tipos celulares como las células olfativas envainadas (similares a glía que liberan factores tróficos y han sido ampliamente utilizadas para la reparación neuronal), células de Schwann, astrocitos inmaduros y más recientemente células mesenquimales como neuroprotectoras (Mendes-Pinehiro *et al.*, 2019). A pesar de no tener un efecto sobre la supervivencia, se han empleado también transgenes para el incremento de la arborización de los axones de las NDa trasplantadas, por ejemplo, a través de la sobreexpresión de *Bcl-2* (Liu and Huang, 2007; Barker *et al.*, 2016).

Como se mencionó, el crecimiento axonal de las células trasplantadas representa una limitante que se refuerza en caso de que se quiera hacer una mejor representación de la estructura *in vivo* al trasplantar las células en la SN. Existen pocos trabajos en los cuales se hace el trasplante en la SNpc, entre ellos se encuentra el artículo de Díaz-Martínez en 2013, en el cual se buscó reproducir con mayor exactitud esta estructura mesencefálica en un modelo *in vivo*. En ese trabajo se resolvió el problema de la distancia requerida entre el sitio de trasplante y el estriado, simulando parcialmente, un evento ocurrido durante el desarrollo embrionario: la atracción de los axones de las NDa por medio de señales solubles

específicas, en este caso, la Sema3C. Sin embargo, esa investigación dio lugar a una nueva pregunta ¿Es posible direccionar/dirigir los axones de las NDa empleadas para los trasplantes (ya sea de ratón o de humano) al liberar la Sema3C desde un polímero biocompatible? Esto aboliría el uso suplementario de células transfectadas que agrega una complicación adicional por usar células no neurales transfectadas. El uso de un material biocompatible para la liberación de Sema3C se comprobó por Carballo-Molina en el artículo publicado en 2016. Consecuentemente, surgió la duda de si este direccionamiento sería reproducible en un modelo semejante a *in vivo*: el cultivo organotípico y que fue el tema de estudio de esta tesis.

Los primeros resultados del proyecto sirvieron como estandarización del modelo y confirmaron la capacidad de las NDa diferenciadas a responder al estímulo de las Sema3C liberada por el hidrogel (ver antecedentes). Sin embargo, los resultados electrofisiológicos nos hicieron considerar que la madurez de las neuronas no era la adecuada al menos para este modelo. Esto debido a que el tiempo de vida de las rebanadas en cultivo es limitado y no se puede permitir la maduración de las células en el trasplante por tiempos muy prolongados sobre el tejido, como se hace generalmente *in vivo*. En efecto, los trasplantes en animales se dejan por lo menos tres semanas, tiempo promedio de vida de las rebanadas. Una posible solución a este problema es mejorar la calidad de vida y tiempo de las rebanadas, lo cual se ha hecho para tejidos difíciles de cultivar como tejido viejo o de cerebro humano (Le Duigou *et al.* 2018). Sin embargo, estos medios son muy costosos y complejos. Otra solución sería hacer el trasplante de neuronas maduras.

Por este motivo se decidió, bajo la misma hipótesis y con el mismo objetivo final -de dirigir los axones de NDa, trasplantadas sobre la rebanada, con el uso del hidrogel biocompatible PuraMatrix previamente cargado con Sema3C- probar la madurez de las células trasplantadas como primer objetivo.

1) Maduración *in vitro* de NDa previamente diferenciadas a partir de hESCs

Para cumplir con este objetivo, se realizó la diferenciación a NDa de 21 días y se dejaron madurar alrededor de 40 días suplementarios. Las hESCs se han usado ampliamente para la diferenciación neuronal: para estudios de optogenética con trasplante de progenitores neurales (Ryu *et al.*, 2019), formación de organoides de mesencéfalo (Jo *et al.*, 2016), diferenciación a neuroectodermo (Liu *et al.*, 2015) y en específico a NDa (Niclis *et al.*, 2017; Kriks *et al.*, 2011). En estos trabajos se muestra la presencia de marcadores específicos de NDa (LMX1a, Pitx3, TH, Girk2, DAT, Tuj1), resultados que hemos reproducido anteriormente en el laboratorio (López-Ornelas, en preparación) y que se reprodujeron para este trabajo a lo largo del tiempo de maduración: con inmunofluorescencias para TH -aunque en

proporciones menores a aquello reportado por los autores del protocolo- y Tuj1 (días 30, 40, 50, 60 y 70), y para otros marcadores como Pitx3 y Girk2, confirmando así la presencia de NDa A9, a pesar de que se ha reportado que en humano las NDa del VTA también lo expresan, aunque con cierta variabilidad (Reyes *et al.*, 2012). Estas últimas tinciones se realizaron al día 40. Finalmente, se mostró la presencia de uno de los receptores a la Sema3C en células de 50 días, como se observa en la Figura 9.

Algunos de los trabajos mencionados también han probado la capacidad electrofisiológica de las células, sin embargo, el tiempo de maduración es incierto. Evidentemente esto varía según el protocolo de diferenciación, pero se ha reportado madurez más allá del día 80 (neuronas en general, Ryu *et al.*, 2019); un incremento en disparos entre los días 30-44, y un fenotipo dopaminérgico alrededor del día 70 (Song *et al.*, 2020); o bien tasas de disparo en las primeras 3 semanas en cultivo (aunque los potenciales de acción mostrados en el artículo corresponden a células de 80 días, Kriks *et al.*, 2011). Estos resultados son consistentes con lo que observamos al hacer registros a lo largo del tiempo de maduración (Figura 10), pues las curvas I-V indicaron la aparición progresiva de los canales necesarios para la formación de potenciales de acción, así como algunas respuestas que evidencian su carácter dopaminérgico. Entre estos: la presencia de disparos de alta frecuencia seguidos de tiempos de quiescencia/silencio mayores al tiempo inter-espiga (denominados ráfagas o *bursting*); la aparición de una respuesta de rectificación tiempo dependiente ante pulsos hiperpolarizantes (mediado por corrientes I_h al activar canales con corrientes hiperpolarizantes); una frecuencia baja de disparo (entre 4-10 Hz) pero por tiempo prolongado, o un umbral de disparo menos bajo (-30 mV), e inclusive algunas presentaron “potenciales de rebote” como respuesta tras una hiperpolarización. A pesar de la presencia de potenciales, las células mantienen un potencial de reposo de -40 hasta -60 mV, distinto a aquel de las neuronas en general, alrededor de -70 mV, también visto en NDa obtenidas por otros protocolos de diferenciación (-55.93 ± 2.43 mV, Song *et al.*, 2020). Es posible que por esta razón hayamos tenido problemas al intentar despolarizarlas para inducir los potenciales, pues el potencial es inestable, lo cual podría estar estresando a la célula e inducir su muerte. Otro detalle a remarcar es la presencia de patrones de disparo en *bursts*. Éste es característico de las NDa, sin embargo, se ha relacionado más bien con registros de preparaciones *in vivo*, mientras que *in vitro* se observa preferentemente un disparo regular de tipo marcapaso. La explicación propuesta para esta diferencia de disparos consiste en la falta de conexiones debido a la inervación en cultivos *in vitro* (Rohbracher, Ichinohe & Kitai, 2000). En nuestros cultivos fue posible observar dicho patrón, posiblemente debido al tiempo de maduración prolongado.

La presencia de la enzima limitante para la producción de Da (TH) no necesariamente implica su liberación ni la capacidad de respuesta de las células ante estímulos eléctricos.

Esto se evidenció en el trasplante de neuronas de 21 días (antecedentes) y posteriormente con los registros a distintos tiempos de maduración (Figura 10), por lo cual fue necesario confirmar la liberación de Da en los cultivos de NDa maduras.

El ensayo de liberación dopaminérgica por medio de estímulo se midió por HPLC y preliminarmente por amperometría. Como se muestra en los resultados, el ensayo por HPLC muestra un incremento en la concentración (alrededor de 60 nM por 2.5×10^5 células) de Da tras un estímulo con alto potasio. Estos resultados son similares al reciente trabajo de Song *et al.*, 2020, en el cual se obtienen precursores dopaminérgicos que tras 47 días en cultivo son capaces de liberar concentraciones del orden de 20 nM (aunque el número de células no fue reportado, se indica únicamente 3.1 ± 0.1 ng/ml de Da y 0.2 ± 0.0 ng/ml de DOPAC). Además, al igual que en el presente trabajo, se reportan concentraciones 15 veces menores de DOPAC con respecto a Da tras el estímulo.

Mientras que la detección Da por HPLC implica un estímulo iónico, la detección de Da por amperometría se dio de manera espontánea en $\approx 20\%$ de las células registradas. Cabe resaltar también que esa prueba se hizo sobre el soma (aunque posiblemente también se hayan captado terminaciones sinápticas que pudieran estar situadas en la cercanía del electrodo). A pesar de que lo ideal o más interesante sería medir la liberación sináptica en el estriado, se ha reportado la liberación vesicular extra-sináptica (somato-dendrítica) de las NDa de la SNpc, principalmente tras estímulos serotoninérgicos y tras estímulos con alto potasio, lo que concuerda con lo observado (Jaffe *et al.*, 1998; Revisado en Trueta and De-Miguel, 2012). Por otro lado, a pesar de estar calibrada, la micropipeta con fibra óptica mide catecolaminas en general, no sabemos con certeza si todas nuestras células registradas fueron dopaminérgicas, pero el porcentaje de células positivas coincide aproximadamente con el porcentaje de células TH+ en cultivo, lo que nos lleva a pensar que se trate de la misma población neuronal. Otro detalle a mencionar es que la respuesta ante el estímulo con KCl no fue evidente, por lo tanto, no podemos afirmar que esto se deba a las condiciones experimentales o que se deba a distintos mecanismos de liberación vesicular somática.

Es importante considerar que se optó por hacer el trasplante en un tiempo de maduración mayor al tiempo en el cual se hicieron las pruebas de direccionamiento axonal en el trabajo de Carballo-Molina y que el direccionamiento en el modelo de cultivo organotípico simula lo ocurrido *in vivo*. Por esta razón, surgió la duda de si los axones de 40 días aún serían capaces de responder a la Sema3C, puesto que la respuesta a las semaforinas y otras señales de guía axonal se da en momentos precisos, por ejemplo, durante el desarrollo. Los cambios en la composición/población del conjunto de receptores a estas señales permiten crear una respuesta espacio-temporal específica: una manera de regular estos conjuntos de

receptores son los cambios en la regulación sobre la expresión de los receptores, o bien por una regulación endocitosis específica. En particular, se ha estudiado la regulación de la expresión de las Neuropilinas, las cuales representan un blanco para múltiples factores transcripcionales a lo largo de la migración neuronal (revisado por Pasterkamp, 2012). El resultado de las Figuras 9 y 13 nos confirman no sólo la presencia de al menos uno de los receptores de la Sema3C en NDa (sería adecuado hacer una inmunotinción contra Nrp2 y/o Plexina) sino una respuesta en cuanto al número y longitud de los axones dirigiéndose a la zona con el hidrogel cargado con Sema3C. En este caso, no se repitieron los controles con proteínas similares a la Sema3C ni con esta última disuelta directamente en el medio, únicamente el hidrogel cargado con H₂O.

Hemos de considerar también que la longitud de los microcanales es de 900 µm, mientras que la distancia de la SN al estriado es de un par de milímetros. No obstante, los axones de las células TH positivas trasplantadas son capaces de recorrer distancias de al menos 2 mm (medido con el plugin de ImageJ NeuronJ). En conclusión, los resultados obtenidos nos permiten afirmar tanto la identidad como la funcionalidad de nuestras células para el trasplante en este modelo.

2) Cultivo organotípico como modelo de la enfermedad de Parkinson

Los cultivos organotípicos se han usado en incremento para el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Revisado por Daviaud *et al.* en 2013) por sus propiedades estructurales y la facilidad para manipular el microambiente, e inclusive se han estudiado algunos aspectos de la PD. La dificultad del modelo en este trabajo consiste en la interacción entre el tejido y el trasplante.

Se han reportado varios trabajos en los cuales se realizan trasplantes celulares sobre cultivos organotípicos ya sea para estudiar el efecto del trasplante sobre el tejido hospedero o para estudiar la interacción entre ambos (André *et al.*, 2018; Tønnesen *et al.*, 2011). Inclusive existen protocolos que describen la siembra de ESCs sobre rebanadas de tejido (Herlenius *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes y dado el crecimiento axonal del trasplante observado sobre las rebanadas (ver antecedentes), podemos considerar que la rebanada mantiene un ambiente sano y permisivo para la integración de las NDa trasplantadas.

Por un lado, es importante considerar que los cultivos organotípicos presentan cierto nivel de marcadores de inflamación y gliosis, principalmente los primeros días de cultivo, lo que coincide con los resultados observados para los ensayos de viabilidad. Dicha inflamación

posiblemente se deba a la axotomía producida al momento de realizar las rebanadas, que conlleva a la muerte de algunas poblaciones neuronales (Revisado en Humpfel, 2015). La pérdida de la SN observada en reportes previos y en este trabajo concuerdan con lo anteriormente mencionado: al realizar un corte al fascículo medio, es decir, al axotomizar las NDa de la SNpc se provoca su muerte durante los primeros días en cultivo. No realizamos pruebas específicas para medir la inflamación/gliosis en el tejido, y es probable que el microambiente al momento de realizar el trasplante (tercer día en cultivo) sea un poco tóxico, aunque libre de hipoxia. A pesar de que esto pueda tener ligeras repercusiones sobre la viabilidad del trasplante, representa más fielmente lo que ocurre en el caso de una enfermedad neurodegenerativa. Además, dicho detalle no es preocupante en cuanto a la viabilidad general del modelo, pues la respuesta inflamatoria solo es temporal (Le Duigou *et al.*, 2018) y la rebanada mantiene su viabilidad por varias semanas en cultivo. Inclusive existen numerosos trabajos en los cuales se emplean estos cultivos para estudiar el efecto tóxico de ciertos fármacos o sustancias. Este es el caso del aminocromo, estudiado en cultivos organotípicos de cerebro medio para analizar la respuesta inflamatoria y la disminución de GDNF y NGF (de Araújo *et al.*, 2018).

Otra cosa a discutir es la procedencia del tejido: mientras que las enfermedades neurodegenerativas se desarrollan en tejidos maduros de pacientes de edad avanzada, la mayoría de los modelos en cultivo organotípico corresponde a tejido de roedores neonatos. Ésto se debe a que el mantenimiento de tejido viejo necesita de medios complejos y muy específicos para cada situación (Le Duigou *et al.*, 2018). Para inducir la condición, algunos autores optan por añadir toxinas como la 6-OHDA, MPTP (en el caso de la PD), sin embargo, nosotros optamos por un corte mecánico pues permite evitar la inducción adicional de una respuesta inflamatoria y representa etapas avanzadas de la enfermedad (Cavaliere, Vicente, & Matute, 2010). En el contexto de este trabajo el uso de un tejido de neonato fue ventajoso, pues se ha reportado que estos son más sensibles a la axotomía debido a la dependencia neuronal hacia los factores tróficos (Humpfel, 2015), y nos permitió obtener un modelo de degeneración de la vía nigro-estriatal, como se mencionó antes.

El estudio de apoptosis por el ensayo de TUNEL nos mostró un incremento (de 10 a 40% en corteza y de 5 a 20% en hipocampo) en la cantidad de células apoptóticas durante los primeros días de cultivo, seguido de una disminución (similar al primer día), lo que concuerda con lo mencionado anteriormente: durante los primeros días de los cultivos organotípicos las capas superficiales celulares se pierden, tiempo tras el que el cultivo se “estabiliza”, como se ha observado en varios estudios al hacer un ensayo de muerte celular con lactato deshidrogenasa (Le Duigou *et al.*, 2018). En este trabajo la región con mayor tasa de muerte celular fue la corteza (hasta 40% a los 4 días), seguida del hipocampo (hasta 20%), mientras que en el estriado observamos pocas células apoptóticas. Estudios previos

sostienen que el hipocampo es una de las regiones más afectadas por la axotomía al hacer cortes de rebanadas de cerebro, mientras que el estriado, en particular la población de interneuronas colinérgicas no se ve afectada (revisado en Humpfel, 2015), a pesar de que su actividad puede cambiar por la falta de inervación proveniente de la SN y tal vez alteraciones en la corteza. En efecto, esto fue lo que se estudió por medio de imagenología de calcio y que se discutirá más adelante. El ensayo de TUNEL nos permitió entonces comprobar la muerte específica de las regiones deseadas, y afirmar que esta no se debe a la muerte general y progresiva del cultivo, sino al daño mecánico ocasionado, en particular, a la vía nigro-estriatal. Sería interesante obtener un control sin daño a la vía haciendo un corte con ángulo paralelo a ella o bien, como sugieren algunos autores, añadiendo factores de crecimiento al medio para evitar la muerte de la población celular de interés (Humpfel, 2015).

A pesar de que la tasa de muerte parece elevada, es importante considerar que en la inmunotinción no estamos observando todo el grosor de la rebanada (en un inicio de 350 μm), por lo cual el 50% observado en corteza, por ejemplo, no indica el 50% del total de la rebanada, sino de las primeras capas celulares.

Otros ensayos de viabilidad, como el mediado por calceína o la detección de actividad celular por imagenología de calcio nos permitieron confirmar la conservación de tejido sano y activo tanto metabólicamente como eléctricamente hasta las tres semanas (no se hicieron pruebas en tejidos con más tiempo). Además, de modo interesante, se pudieron detectar numerosas células activas de manera espontánea en el estriado, lo que dió lugar a los experimentos que discutiré a continuación. Basándonos en reportes en los cuales se analiza la actividad estriatal (Carrillo-Reid *et al.*, 2008; Pérez-Ortega *et al.*, 2016), se hizo un análisis de la actividad de los microcircuitos en dicha región en rebanadas de al menos dos semanas en cultivo.

Nuestros cultivos organotípicos presentaron actividad estriatal muy elevada y, al formar los grupos de coactividad, siempre con un grupo dominante sobre los demás (Figuras 17 y 18). Esto coincide con la ausencia de interacción dopaminérgica que ocasiona la muerte celular en la SN, y con los resultados en animales parkinsonianos lesionados, por lo cual pudimos reafirmar la validez de nuestro modelo. Con estos resultados surgió la idea de estudiar de manera indirecta los efectos del trasplante sobre el tejido hospedero: si la actividad estriatal puede recuperarse y regresar a la actividad basal, tal vez el trasplante podría tener el mismo efecto. Para esto, sería necesario que al menos una proporción de axones lograran llegar al estriado, o al menos cerca, y que sean capaces de liberar la cantidad suficiente de Da.

3) Trasplante de NDa sobre la SN de cultivo organotípico

El trasplante de las NDa sobre las rebanadas se estandarizó previamente por Carballo-Molina, empleando 100 mil células por rebanada, cifra que se conservó al momento de sembrar las células. A pesar de no usar el microinyector, éstas se colocan sobre la SN y son fáciles de localizar al microscopio de epifluorescencia antes y después de realizar una inmunohistoquímica. Sin embargo, a pesar de la fluorescencia, fue difícil realizar el patch clamp sobre ellas.

No se realizaron otras tinciones (GFAP, vimentina) para medir la cantidad y morfología de la glía, pero es muy posible que la gliosis ocasionada por el corte dificulte el paso de la micropipeta para hacer el sello. Como comenta Herlenius en su revisión (2015), esto puede reducirse según el medio empleado (como en el caso de un modelo de epilepsia en cultivo organotípico, Magalhães *et al.*, 2018), o haciendo el *patch clamp* en la primera semana tras el trasplante. Sin embargo, debido al tiempo que le toma a las células proyectar sus axones (esto se pudo observar al momento de hacer el ensayo de crecimiento axonal, Figura 13), se estandarizó a hacerlo tras diez días de co-trasplante. Aunque poco probable, otra explicación a la aparición de la capa gelatinosa es el hecho de que el trasplante proviene de células humanas, mientras que el tejido hospedero es de rata. Si esto ocurriese, no debería presentar problema al realizarse *in vivo*, pues se realiza una inmunosupresión para evitar un rechazo por parte del huésped.

A pesar de las dificultades mencionadas, se obtuvieron algunos casos exitosos en los cuales se pudo sellar la célula, y un caso en particular en el cual se pudieron registrar potenciales de acción, respuestas de rebote e inclusive un ligero *sag*. Otras células que indicaban tener las mismas propiedades no aguantaron el sello e inyección de corriente por mucho tiempo. La Figura 16 nos muestra la mejor célula registrada, a la cual se le inyectó biocitina y posteriormente se le hizo una inmunofluorescencia para comprobar su identidad dopaminérgica medida por la presencia de TH. En el caso de querer realizar más de estos registros, sería conveniente estudiar la actividad de las células del trasplante con mayor facilidad por otros métodos que el *patch clamp whole cell*, ya sea por registro intracelular (la pipeta no hace un sello con la membrana, sino que la atraviesa y mide las corrientes), por imagen de calcio o por liberación de neurotransmisor por amperometría. También es posible ver la integración del trasplante sobre la rebanada por medio de comunicaciones celulares por uniones gap al inyectar algún fluoróforo en una célula del trasplante y ver si éste llega a las células del hospedero (Herlenius *et al.*, 2012). Inclusive se ha empleado la calceína-AM previamente cargada en las células a trasplantar para ver este tipo de comunicación. Estos métodos no fueron posibles debido a complicaciones técnicas relacionadas a la fluorescencia que presenta nuestra línea celular GFP+.

En algunas rebanadas pudimos observar, si bien no una reconexión evidente desde la SN hasta el estriado, proyecciones hacia él o cercanas (suplementarias), e inclusive células GFP positivas cercanas al mismo (aunque esto pueda deberse a una migración o simplemente al transporte por flujo al momento de hacer el trasplante). Adicionalmente, al realizar inmunotinciones para TH en las NDa, pudimos observar células TH+ (Figura 16).

Como en los trabajos previos mencionados en la introducción, empleamos la imagenología de calcio en conjunto con la teoría de redes para estudiar la actividad de poblaciones neuronales en el estriado. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron en nuestros cultivos organotípicos una actividad muy similar a aquella presente en rebanadas agudas de animales lesionados. Esto nos permitió reafirmar la semejanza de nuestro modelo con un cerebro parkinsoniano y, dadas las complicaciones para estudiar directamente la actividad del trasplante, estudiar de modo indirecto el efecto del trasplante sobre la rebanada/el cultivo organotípico.

Hay que resaltar que una diferencia entre los trabajos descritos y nuestro modelo es la edad de los animales empleados: nuestros cultivos provienen de neonatos de 7 días, mientras que la mayoría de los análisis reportados proviene de animales adultos. Es difícil determinar si nuestro cultivo al finalizar el experimento corresponde al día 20-23, si consideramos que las rebanadas continúan su maduración *ex vivo*, o al día 7 post natal si consideramos que se “congelan” al momento de hacer el cultivo. Sin embargo, se ha reportado que en neonatos la actividad estriatal es mayor debido a una hiperexcitabilidad ocasionada por falta de madurez de canales kir, que cambia en una ventana de tiempo entre los 18-28 días de manera Da dependiente (Lieberman *et al.*, 2018). De acuerdo con esto, pudimos observar en rebanadas agudas provenientes de animales de 8 días, en un inicio empleados como control, dicha hiper excitabilidad, aún sin agregar NMDA (no se muestran datos). Por este motivo lo primero que se quiso evaluar fue si la actividad estriatal parkinsoniana de nuestros cultivos era reversible. Esto representaría entonces cambios funcionales (dados por plasticidad sináptica) y no físicos (dados por inmadurez del tejido) en nuestro circuito.

En artículos anteriores se demostró que antagonistas de los receptores glutamatérgicos o agonistas de receptores dopaminérgicos son capaces de revertir la condición patológica *in vitro* (Jaídar *et al.*, 2010). Por este motivo, probamos la adición de L-DOPA (precursor de la Da) en el baño de perfusión de las rebanadas con actividad parkinsoniana. Los resultados fueron variables/inconsistentes y no se observó un efecto claro o una reversión de la actividad. Es posible que esto se deba a la pérdida completa de las neuronas dopaminérgicas en nuestro modelo (como lo muestra la Figura 14), por lo cual no quedan suficientes neuronas capaces de recapturar la L-DOPA y sintetizar la Da.

Seguido a esto, se decidió probar con un agonista de los receptores D2 de la Da que en trabajos previos mostró resultados positivos en cuanto a la recuperación de la actividad estriatal basal: el pramipexole (Lara-González *et al.*, 2019). La respuesta positiva ante el pramipexol en nuestro modelo descartó la inmadurez estriatal ocasionada por la pérdida de la vía nigro-estriatal durante los primeros días en cultivo. Además, sumado a la hiper excitabilidad, pudimos observar la presencia de un grupo dominante, como reportado previamente (Pérez-Ortega *et al.*, 2016), aunque no se ha reportado el patrón de coactividad en neonatos.

Efectivamente, la adición de pramipexol tuvo un efecto reductor en el número de células activas y de la actividad de estas mismas a lo largo del tiempo, lo cual produjo como consecuencia una disminución en el número de estados de coactividad. Cabe resaltar la aparición de un grupo de neuronas activas al agregar pramipexol, semejante a aquello reportado previamente al estimular la corteza sin adición de NMDA (Aparicio-Juárez *et al.*, 2017) aunque sin alternancia.

Por otro lado, la presencia del trasplante+Sema3C (+NDa) mostró cambios interesantes en la actividad estriatal: se observó una disminución aparente en el número de células activas. Al considerar el número de transitorios a lo largo de los videos, a pesar de tener una menor cantidad de células activas, éstas muestran una mayor excitabilidad. Si consideramos el total de las células activas para todas las repeticiones (CDF, Figura 17) esta diferencia no es significativa. Esto posiblemente se deba a la mayor variabilidad que observamos en el tratamiento con trasplante celular.

El resultado al analizar la recurrencia de cada estado de coactividad (índice de recurrencia) resulta interesante pues se asemeja más a un estriado no lesionado+NMDA o estimulado corticalmente, a pesar de que sigue presentando un estado dominante. Nuevamente, a pesar de no ver una diferencia significativa con respecto a la condición sin Da, podemos destacar la presencia de más grupos que permiten una mayor alternancia entre ellos. Estos aparentes cambios son sin duda el resultado de la variabilidad que se obtiene al momento de hacer un trasplante pues, como se puede apreciar en los box plot, algunas rebanadas mostraron mejoría, mientras que otras no.

Adicionado a esto y considerando los resultados obtenidos en el ensayo de TUNEL y los antecedentes previamente reportados por otros grupos, podríamos pensar en una alteración cortical de nuestras rebanadas en cultivo (además de la pérdida de Da) que esté jugando un papel adicional sobre la actividad de nuestros microcircuitos estriatales. No podemos hablar de una decorticación total, puesto que vimos actividad en corteza por

imagen de calcio, pero sí de un cambio estructural. En efecto, a pesar de ser relativamente estables en cuanto a la estructura original, los cultivos organotípicos pueden presentar alteraciones en los circuitos/sinápticas ocasionadas por la axotomía y el cambio de ambiente (Herlenius *et al.*, 2012).

7- Conclusiones

Las neuronas diferenciadas a partir de hESCs presentaron marcadores de NDa, actividad eléctrica inducida y en algunos casos espontánea, liberación de Da y la capacidad de responder ante un estímulo con Sema3C. Se puede decir que, al momento de hacer el trasplante, se trata de NDa maduras capaces de extender sus axones sobre la rebanada. Por otro lado, las rebanadas de cerebro de rata permanecieron viables en cultivo por más de tres semanas. Además, presentan características similares a un tejido parkinsoniano sin necesidad de tratamiento con fármacos, esto es, pérdida de la vía nigro-estriatal y actividad estriatal semejante a lo hallado en animales lesionados con 6-OHDA. Además, dicha actividad es recuperable con el uso de fármacos. Podemos concluir entonces que nuestro cultivo es un buen modelo para realizar estudios relacionados a la PD.

En lo que respecta al trasplante de NDa maduras, aunque variables, obtuvimos resultados positivos: las células trasplantadas son capaces de extender sus axones sobre la rebanada, así como de mantener sus propiedades electrofisiológicas y mantener la población de neuronas TH positivas. El efecto sobre la actividad estriatal que es, a fin de cuentas, el objetivo de un trasplante, no resulta claro. Esto se debe posiblemente a la variabilidad que conlleva hacer un trasplante, sin embargo, tenemos razones para creer que con la optimización de la técnica podremos obtener resultados consistentes y positivos.

8- Perspectivas

Tener un modelo de estudio para la PD es relevante no solo para el uso de trasplantes celulares, sino que también resulta atractivo para la prueba con fármacos como posibles tratamientos de la enfermedad.

Además, las técnicas empleadas para este proyecto *per se* podrían darnos más información acerca tanto de nuestro modelo como de nuestras NDa diferenciadas. Por ejemplo, con la técnica de amperometría podríamos estudiar y comparar los mecanismos de acción de liberación de vesículas de neurotransmisor; podríamos utilizar esta técnica (en conjunto con HPLC) para estudiar la liberación sináptica en neuronas sembradas en cámaras de crecimiento axonal.

9- Referencias

- André E. M., Daviaud N., Sindji L., Cayon J., Perrot R., Montero-Menei C. N. (2018). A novel ex vivo Huntington's disease model for studying GABAergic neurons and cell grafts by laser microdissection. *PLoS ONE* 13(3) e0193409.
- Aparicio-Juarez, A., M. Duhne, E. Lara-Gonzalez, F. Avila-Cascajares, V. Calderón, E. Galarraga, Bargas J. (2018). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 49(SI), 834-848
- Araújo, F., Ferreira, R., Souza, C., Santos, C., Rodrigues, T., Silva, J., Gasparotto, J., Gelain, D., El-Bachá, R., Costa, M., Fonseca, J., Segura-Aguilar, J., Costa, S., Silva, V. (2018). Aminochrome decreases NGF, GDNF and induces neuroinflammation in organotypic midbrain slice cultures. *Neurotoxicology* 66, 98-106.
- Arenas, E., Denham, M. & J.C. Villaescusa. (2015). How to make midbrain dopaminergic neuron. *Development*, 142, 1918-1936.
- Aurand, E. R., Lampe, K. J., & Bjugstad, K. B. (2012). Defining and Designing Polymers and Hydrogels for Neural Tissue Engineering. *Neuroscience Research* 72(3), 199–213.
- Barker, R. A., M. Parmar, A. Kirkerby, A. Björklund, L. Thompson, Brundin, P. (2016). Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016? *Journal of Parkinson's Disease* 6, 57–63.
- Carballo-Molina, O. A., Sánchez-Navarro, A., López-Ornelas, A., Lara-Rodarte, R., Salazar, P., Campos-Romo, A., ... Velasco, I. (2016). Semaphorin 3C Released from a Biocompatible Hydrogel Guides and Promotes Axonal Growth of Rodent. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*, 22(11–12), 850–861.
- Carballo-Molina, O. A., & Velasco, I. (2015). Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9, 1–12.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *Journal of neurophysiology* 99(3), 1435-50.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Bargas, J. (2009). Activation of the Cholinergic System Endows Compositional Properties to Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology* 101(2), 737-749.
- Cavaliere, F., Vicente, E. S., & Matute, C. (2010). An organotypic culture model to study

- nigro-striatal degeneration. *Journal of Neuroscience Methods*, 188(2), 205–212.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.02.008>
- Cho, E. S., Lee, S. Y., Park, J.-Y., Hong, S.-G., & Ryu, P. D. (2007). Organotypic slice culture of the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *Journal of Veterinary Science*, 8(1), 15–20.
- Dauer, W. & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39, 889-909.
- Daviaud, N, Garbayo, E., Lautram, N., Franconi, F., & Lemaire, L. (2014). Modeling Nigrostriatal Degeneration in Organotypic Cultures, a New Ex Vivo Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience*, 256, 10–22.
- Daviaud, Nicolas, Garbayo, E., Schiller, P. C., Perez-pinzon, M., & Montero-menei, C. N. (2013). Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Experimental Neurology*, 248, 429–440.
- Díaz-Martínez, N. E., Tamariz, E., Díaz, N. F., García-peña, C. M., Varela-echavarría, A., & Velasco, I. (2013). Recovery From Experimental Parkinsonism by Semaphorin-guided Axonal Growth of Grafted Dopamine Neurons. *Molecular Therapy*, 21(8), 1579–1591.
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. R., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., ... Fahn, S. (2001). Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease, 344(10), 710–719.
- Fu, Y., Paxinos, G., Watson, C., & Halliday, G. M. (2016). The substantia nigra and ventral tegmental dopaminergic neurons from development to degeneration. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 76, 98-107.
- Gale, E. & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*, 1, 8.
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). NIH Public Access. *Annu Rev Neurosci*, 34, 441–466.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>.Modulation
- Goldman, S. M. (2014). Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 54,141-164.
- Halliday, G. M. & McCann, H. (2010). The progression of pathology in Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1184, 188-195.
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M. & O'Keefe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*, 379, 123-138.

- Herlenius, E., Thonabulsombat, C., Forsberg, D., Jäderstad, J., Jäderstad, L., Björk, L., Olivius, P. (2007). Functional Stem Cell Integration Assessed by Organotypic Slice Cultures. *Current protocols in stem cell biology* Chapter 2(1), Unit 2D.13.1-2D.13.26
- Hernández-Montiel, H. L., Tamariz, E., Sandoval-Minero, M. T., & Varela-Echeverría, A. (2008). Semaphorins 3A, 3C, and 3F in Mesencephalic Dopaminergic Axon Pathfinding. *The Journal of Comparative Neurology*, 506, 387-397.
- Holmes, T. C., Lacalle, S. De, Su, X., Liu, G., Rich, A., & Zhang, S. (2000). Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *PNAS*, 97(12), 6728–6733.
- Humpel, C. (2015). Neuroscience Forefront Review Organotypic Brain Slice Cultures: A Review. *Neuroscience*, 305, 86–98
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30(34), 11326-36.
- Jiang, P., & Dickson, D. W. (2017). Parkinson's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 135, 13-32.
- Kearns, S. M., Scheffler, B., Goetz, A. K., Lin, D. D., Baker, H. D., Roper, S. N., ... Steindler, D. A. (2006). A method for a more complete in vitro Parkinson's model: Slice culture bioassay for modeling maintenance and repair of the nigrostriatal circuit. *J. Neurosci. Methods* 157, 1–9.
- Kim, J., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Nadya, L., ... McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418, 50–56.
- Kordower, J. H. & A. Bjorklund (2013). Trophic Factor Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Movements Disorders*. 28(1), 96-109.
- Koutsopoulos, S., & Zhang, S. (2013). Acta Biomaterialia Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, Matrigel and Collagen I. *Acta Biomaterialia*, 9(2), 5162–5169.
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626.
- Kriks, S., Shim, J., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., & Carrillo-Reid, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of

- Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551.
- Le Duigout C., Savary, E., Maurine-Brureau, M., Gome-Dominguez, D., Sobczyk, A., Charli, F., ... Miles, R. (2018). Imaging pathological activities of human brain tissue in organotypic culture. *Journal of Neuroscience Methods*, 298, 33-44.
- Liu, B. P., & Strittmatter, S. M. (n.d.). Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins, *Curr Opin Cell Biol.* 13(5), 619–626.
- Liu, J. and Huang H.-Y. (2007). How to improve the survival of the fetal ventral mesencephalic cell transplanted in Parkinson's disease? *Neuroscience Bulletin*, 23(6), 377-382.
- Jeffe, E. H., Marty, A., Schulte, A., & Chow, R. H. (1998). Extrasynaptic Vesicular Transmitter Release from the Somata of Substantia Nigra Neurons in Rat Midbrain Slices, *The Journal of Neuroscience*, 18(19), 3548-3553.
- Jo, J., Xiao, Y., Sun, A., Cukuroglu, E., Tran, H., Göke, J., Tan, Z., Saw, T., Tan, C., Lokman, H., Lee, Y., Kim, D., Ko, H., Kim, S., Park, J., Cho, N., Hyde, T., Kleinman, J., Shin, J., Weinberger, D., Tan, E., Je, H., Ng, H. (2016). Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell stem cell* 19(2), 248-57.
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., Keitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622-626.
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., Cruz, S., Bargas, J. (2019). Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights. *Neuroscience* 410, 76-96.
- Lieberman, O., McGuirt, A., Mosharov, E., Pigulevskiy, I., Hobson, B., Choi, S., Frier, M., Santini, E., Borgkvist, A., Sulzer, D. (2018). Dopamine Triggers the Maturation of Striatal Spiny Projection Neuron Excitability during a Critical Period. *Neuron* 99(3), 540-554.
- Lopes, F. M., Bristot, I. J., Da Motta, L. L., Parsons, R. B., and Klamt, F. (2017). Mimicking Parkinson's disease in a dish: merits and pitfalls of the most commonly used dopaminergic in vitro models. *Neuromol. Med.* 19, 241–255.
- Magalhães, D., Pereira, N., Rombo, D., Beltrão-Cavacas, C., Sebastião, A., Valente, C. (2018). Ex vivo model of epilepsy in organotypic slices—a new tool for drug screening *Journal of Neuroinflammation* 15(1), 203.
- Mallet N., Ballion B., Le Moine C., Gonon F. (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26,3875–

- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009). Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, 29(2), 444-453.
- Mendes-Pinheiro, B., Anjo, S., Manadas, B., Silva, J., Marote, A., Behie, L., Teixeira, F., Salgado, A. (2019). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells' Secretome Exerts Neuroprotective Effects in a Parkinson's Disease Rat Model. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 7(1), 294.
- Mewes, A., Franke, H., & Singer, D. (2012). Organotypic Brain Slice Cultures of Adult Transgenic P301S Mice- A Model for Tauopathy Studies. *PLoS ONE*, 7(9), e45017.
- Niclis, J., Gantner, C., Alsanie, W., McDougall, S., Bye, C., Elefanty, A., Stanley, E., Haynes, J., Pouton, C., Thompson, L., Parish, C. (2016). Efficiently Specified Ventral Midbrain Dopamine Neurons from Human Pluripotent Stem Cells Under Xeno-Free Conditions Restore Motor Deficits in Parkinsonian Rodents. *STEM CELLS Translational Medicine* 6(3), 937-948.
- Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J., Otsmane, B., Parras, C., ... Yanagawa, Y. (2009). Transient Neuronal Populations Are Required to Guide Callosal Axons: A Role for Semaphorin 3C. *PLOS Biology*, 7(10), 1–20.
- Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2), 223-236. Originally published as a monograph by Sherwoor, Neely and Jones in 1817
- Pasterkamp, R. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins *Nature Reviews Neuroscience* 13(9), 605-618.
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of disease*. 91:347-61.
- Piccini, P., Brooks, D. J., Bjorklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. N., Rimoldi, O., ... Lindvall, O. (1999). Dopamine Release from Nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1137-1140.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., ... Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–21.
- Reyes, S., Fu, Y., Double, K., Thompson, L., Kirik, D., Paxinos, G., Halliday, G. (2012). GIRK2 expression in dopamine neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area. *The Journal of comparative neurology* 520(12), 2591-607.

- Rohrbacher, J., Ichinohe, N. & Kitai, S. T. (2000). Electrophysiological characteristics of substantia nigra neurons in organotypic cultures: spontaneous and evoked activities. *Neuroscience*, 97(4), 703-714.
- Ryu, J., Vincent, P., Ziogas, N., Xu, L., Sadeghpour, S., Curtin, J., Alexandris, A., Stewart, N., Sima, R., Lac, S., Glowatzki, E., Koliatsos, V. (2019). Optogenetically transduced human ES cell-derived neural progenitors and their neuronal progenies: Phenotypic characterization and responses to optical stimulation, *PLOS ONE* 14(11), e0224846.
- Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., & Taniguchi, T. (2003). Disease model : Parkinson's disease, *Trends in Molecular Medicine*, 9(8), 360–365.
- Simorgh, S., Alizadeh, R., Eftekhazadeh, M., Haramshahi, S., Milan, P., Doshmanziari, M., Ramezanpour, F., Gholipourmalekabadi, M., Seifi, M., Moradi, F. (2019). Olfactory mucosa stem cells: An available candidate for the treatment of the Parkinson's disease. *Journal of cellular physiology* 234(12), 23763-23773.
- Song, B., Cha, Y., Ko, S., Jeon, J., Lee, N., Seo, H., Park, K., Lee, I., Lopes, C., Feitosa, M., Luna, M., Jung, J., Kim, J., Hwang, D., Cohen, B., Teicher, M., Leblanc, P., Carter, B., Kordower, J., Bolshakov, V., Kong, S., Schweitzer, J., Kim, K. (2020). Human autologous iPSC-derived dopaminergic progenitors restore motor function in Parkinson's disease models. *The Journal of clinical investigation*, 130(2), 904-920.
- Stahl, K., Skare, Ø., & Torp, R. (2009). Organotypic Cultures as a Model of Parkinson's Disease. A Twist to an Old Model. *The Scientific World*, 9, 811-821.
- Steinbach, K., Volkmer, H., & Schlosshauer, B. (2002). Semaphorin 3E / Collapsin-5 Inhibits Growing Retinal Axons. *Experimental Cell Research*, 61, 52–61.
- Stoppini, L. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*. 37, 173–182.
- Surmeier, D. J., Halliday, G. M., & Simuni, T. (2017). Calcium, mitochondrial dysfunction and slowing the progression of Parkinson's disease. *Exp Neurol.*, 298(PtB), 202-209.
- Takaoka, K., Yamamoto, M. & Hamada, H. (2007). Origin of body axes in the mouse embryo, *Current Opinion in Genetics & development*, 17, 344-350
- Tanimura, A., Pancani, T., Lim, S. A. O., Tubert, C., Melendez, A. E., Shen, W., & Surmeier, D. J. (2017). Striatal cholinergic interneurons and Parkinson's disease, *The European Journal of Neuroscience* 47, 1148-1158.
- Tønnesen, J., Parish, C., Sørensen, A., Andersson, A., Lundberg, C., Deisseroth, K., Arenas, E., Lindvall, O., Kokaia, M. (2011). Functional integration of grafted neural stem cell-derived dopaminergic neurons monitored by optogenetics in an in vitro Parkinson

model. *PloS one* 6(3), e17560.

Trueta, C., De-Miguel, F. (2012). Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Frontiers in physiology* 3(319), 1-19.

Ullrich, C., Daschil, N. & C. Humpfel. (2011). Organotypic Vibrosections: Novel Whole Sagittal Brain Cultures, *Journal of Neuroscience Methods*, 201, 131-141.

Van Battum, E. Y., Brignani, S., & Pasterkamp, R. J. (2015). Axon Guidance Proteins in Neurological Disorders, *The Lancet Neurology*, 14(5), 532-546.

Xue, J., Liu, Y., Darabi, M., Tu, G., Huang, L., Ying, L., Xiao, B., Wu, Y., Xing, M., Zhang, L., Zhang, L. (2019). An injectable conductive Gelatin-PANI hydrogel system serves as a promising carrier to deliver BMSCs for Parkinson's disease treatment. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 100, 584-597.

Yuzaki, M. (2018). Two Classes of Secreted Synaptic Organizers in the Central Nervous System. *Annual Review of Physiology*, 80, 243-262, 1–20.

Zhai, S. et al. (2018). Striatal synapses, circuits, and Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 48, 9-16.