



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**“PAPEL DEL GDNF EN LA DIFERENCIACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DIFERENCIADAS DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS”.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

Doctor en Ciencias

**PRESENTA:**

L.B.E. Ernesto José Rolando Lara Rodarte

**TUTOR PRINCIPAL**

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez  
Instituto de Fisiología Celular

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dr. Julio Morán Andrade  
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Jesús Chimal-Monroy  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Octubre 2022.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Al Dr. Daniel Cortés Pérez por la amable donación de las líneas celulares GDNF-ESC y CTRL-ESC.

A la Dra. Luisa Rocha y Francia Carmona del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por permitirnos usar su equipo de detección por HPLC.

Al jurado de mi examen de grado

## ÍNDICE

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>I.</b>    | <b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>II.</b>   | <b>RESUMEN.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>III.</b>  | <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>IV.</b>   | <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>V.</b>    | <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>9</b>  |
|              | 5.1 Células troncales y pluripotencia.....  | 9         |
|              | 5.1.1 Tipos y características de las células troncales pluripotenciales.....  | 9         |
|              | 5.1.2 Características de las células troncales embrionarias.....  | 10        |
|              | 5.1.3 Células troncales pluripotenciales y su uso en investigación.....   | 11        |
|              | 5.2 Terapia de remplazo celular en la Enfermedad de Parkinson.....  | 13        |
|              | 5.2.1 Enfermedad de Parkinson.....  | 14        |
|              | 5.2.2 Síntomas de la EP.....  | 14        |
|              | 5.2.3 Características fisiopatológicas de la EP.....  | 14        |
|              | 5.2.4 Patofisiología de los circuitos neuronales durante la EP.....   | 16        |
|              | 5.2.5 Tratamientos para la EP.....  | 17        |
|              | 5.2.5.1 Tratamientos farmacológicos.....  | 18        |
|              | 5.2.5.2 Estimulación profunda del cerebro.....  | 19        |
|              | 5.2.5.3 Terapia génica.....   | 19        |
|              | 5.2.5.4 Terapia de reemplazo celular para el tratamiento de la EP.....  | 19        |
|              | 5.3 Diferenciación dirigida de NDAs a partir de ESC.....  | 20        |
|              | 5.3.1 Desarrollo temprano del MV.....   | 21        |
|              | 5.3.2 Regulación genética en el desarrollo del MV.....  | 23        |
|              | 5.3.3 Métodos de diferenciación dopaminérgica.....  | 24        |
|              | 5.4 Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).....   | 27        |
|              | 5.4.1 Señalización de GDNF.....   | 27        |
|              | 5.4.2 GDNF en el tratamiento de la EP.....  | 29        |
| <b>VI.</b>   | <b>ANTECEDENTES.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>VII.</b>  | <b>JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>HIPÓTESIS.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>OBJETIVO.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>X.</b>    | <b>MÉTODOS.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>XI.</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>39</b> |
|              | 10.1 La sobreexpresión de GDNF en la línea GDNF-CTRL no afecta el protocolo de diferenciación.....                                | 39        |
|              | 10.2 El GDNF genera más NDAs que son más resistentes a 6-OHDA.....  | 41        |
|              | 10.3 El trasplante de las NDAs derivadas de mESC en el estriado promueve recuperación conductual en ratas hemiparkinsonianas..... | 44        |
|              | 10.4 El trasplante de NDAs promueve la liberación de DA en el estriado.....   | 45        |
|              | 10.5 Distribución de las NDAs derivadas de CTRL-ESC Y GDNF-ESC después del trasplante.....  | 46        |
| <b>XII.</b>  | <b>DISCUSIÓN.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>XIII.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>55</b> |

## I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura I</b> Características de las células troncales pluripotentes (PSC).....   | 10 |
| <b>Figura II</b> Fisiopatología de la EP.....   | 15 |
| <b>Figura III</b> Circuito corticoestriatal en la EP. ....  | 17 |
| <b>Figura IV</b> Desarrollo del mesencéfalo ventral .....   | 22 |
| <b>Figura V</b> Protocolos de diferenciación de ESC usando el método de inhibición dual<br>de SMAD .....  | 26 |
| <b>Figura VI</b> Señalización de GDNF .....   | 28 |
| <b>Figura 1</b> Los marcadores de pluripotencia no se ven afectados en las líneas CTRL- y GDNF-ESC<br>antes de la diferenciación dopaminérgica..... | 39 |
| <b>Figura 2</b> El GDNF es liberado al medio y sus receptores con expresados durante las diferentes<br>etapas de la diferenciación.....             | 40 |
| <b>Figura 3</b> El GDNF incrementa la diferenciación dopaminérgica .....  | 41 |
| <b>Figura 4</b> Efectos del GDNF en otras etapas de la diferenciación dopaminérgica.....  | 42 |
| <b>Figura 5</b> La sobreexpresión de GDNF promueve la supervivencia de las neuronas TH<br>positivas después del reto con 6-OHDA.....                | 43 |
| <b>Figura 6</b> Evaluación conductual de las ratas hemiparkinsonianas después del trasplante.....   | 45 |
| <b>Figura 7</b> Cuantificación de DA liberada in vivo.....  | 46 |
| <b>Figura 8</b> Trasplante de NDas derivadas CTRL-ESC y GDNF-ES en el estriado de animales<br>lesionados.....                                       | 47 |
| <b>Tablas</b>   |    |
| Tabla 1 Protocolos de diferenciación usando ESC .....   | 12 |
| Tabla 2 Uso de células diferenciadas de ESC en modelos animales.....  | 13 |
| Tabla 3 Lista de anticuerpos usados en inmunocitoquímica .....  | 35 |

## II. RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (NDAs) de la *sustantia nigra pars compacta* (SNpc), la concomitante denervación de estriado dorsal y la disminución de dopamina (DA) en el cerebro. El trasplante de NDAs diferenciadas de células troncales embrionarias (CTEs) ha sido propuesto como una terapia alternativa a los tratamientos farmacológicos actuales. Los trasplantes intraestriatales de NDAs diferenciadas de CTEs de humano (CTEh) y de ratón (CTEm), han mostrado mejora en la actividad motora, restauración de los niveles de DA y supresión de la hipersensibilidad de receptores a DA; sin embargo, un gran porcentaje de estas neuronas mueren durante el trasplante. El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) es un factor que promueve la supervivencia de NDAs *in vitro* e *in vivo*, además de inducir el crecimiento axonal y la maduración. En este trabajo, nosotros diseñamos CTEm que producen GDNF recombinante humano de forma constitutiva, para analizar su efecto en la diferenciación dopaminérgica y la posible neuroprotección después de un reto tóxico *in vitro* o posterior al trasplante en el estriado de ratas parkinsonianas. La sobreexpresión de GDNF durante la diferenciación *in vitro* de CTEm incrementó la proporción de DNAs del mesencéfalo ventral. Estas células transgénicas fueron menos sensibles que una línea control a la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) *in vitro*. Los animales trasplantados con las células control y las células transgénicas mostraron una mejoría en las pruebas conductuales farmacológicas y no farmacológicas, así como un incremento en los niveles de DA en el estriado, indicando que estas NDAs son funcionales en el cerebro. En los animales trasplantados con las células que expresaban el GDNF, el volumen del trasplante, el número de neuronas que sobrevivieron y el número de NDAs presentes en el estriado fue significativamente mayor comparado con los animales trasplantados con las células control. El uso de este sistema es novedoso ya que algunos trabajos publicados habían utilizado el cotrasplante de NDAs con otros tipos células que expresaban el GDNF o usando sistemas de transducción lentiviral posterior al trasplante de las NDAs. Estas CTE que expresan GDNF pueden ser útiles para mejorar la supervivencia neuronal posterior a los trasplantes.

**Palabras clave:** Células troncales embrionarias, GDNF, neuronas dopaminérgicas, enfermedad de Parkinson, 6-hidroxidopamina.

### III. ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive loss of midbrain dopaminergic neurons (DaNs) of the *substantia nigra pars compacta* and the decrease of dopamine in the brain. Grafting DaN differentiated from embryonic stem cells (ESCs) has been proposed as an alternative therapy for current pharmacological treatments. Intrastratial grafting of such DaNs differentiated from mouse or human ESCs improves motor performance, restores DA release, and suppresses dopamine receptor super-sensitivity. However, a low percentage of grafted neurons survive in the brain. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a strong survival factor for DaNs. GDNF has proved to be neurotrophic for DaNs *in vitro* and *in vivo* and induces axonal sprouting and maturation. Here, we engineered mouse ESCs to constitutively produce human GDNF, to analyze DaN differentiation and the possible neuroprotection by transgenic GDNF after toxic challenges *in vitro*, or after grafting differentiated DaNs into the striatum of Parkinsonian rats. GDNF overexpression throughout *in vitro* differentiation of mouse ESCs increases the proportion of midbrain DaNs. These transgenic cells were less sensitive than control cells to 6-hydroxydopamine *in vitro*. After grafting control or GDNF transgenic DaNs in hemi-Parkinsonian rats, we observed significant recoveries in both pharmacological and non-pharmacological behavioral tests, as well as increased striatal DA release, indicating that DaNs are functional in the brain. The graft volume, the number of surviving neurons, the number of DaNs present in the striatum, and the proportion of DaNs in the grafts were significantly higher in rats transplanted with GDNF-expressing cells, when compared to control cells. Interestingly, no morphological alterations in the brain of rats were found after grafting of GDNF-expressing cells. This approach is novel, because previous works have used co-grafting of DaNs with other cell types that express GDNF, or viral transduction in the host tissue before or after grafting of DaNs. In conclusion, GDNF production by mouse ESCs contributes to enhanced midbrain differentiation and permits a higher number of surviving DaNs after a 6-hydroxydopamine challenge *in vitro*, as well as post-grafting in the lesioned striatum. These GDNF-expressing ESCs can be useful to improve neuronal survival after transplantation.

**Keywords:** Embryonic Stem Cells, GDNF, dopaminergic neurons, Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine.



#### IV. ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| 6-OHDA        | 6-hidroxi dopamina  |
| AADC          | Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos                        |
| AP            | Antero-posterior  |
| BDNF          | Factor neurotrófico derivado del cerebro                        |
| bFGF          | Factor de crecimiento fibroblástico básico                      |
| BMP           | Proteínas morfogénicas del hueso                                |
| COMT          | Catecol-O-metiltransferasa                                      |
| CTRL-ESC      | Células troncales embrionarias de ratón control                 |
| DA            | Dopamina  |
| DAT           | Transportador de dopamina                                       |
| DBS           | Estimulación profunda del cerebro                               |
| DOPAC         | Ácido 3-4 dihidroxifenilacético                                 |
| DV            | Dorso-ventral   |
| EB            | Cuerpos embrioides  |
| ELISA         | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima                      |
| EP            | Enfermedad de Parkinson   |
| Epi           | Epiblasto   |
| ESC           | Células troncales embrionarias                                  |
| FGF           | Factor de crecimiento fibroblástico                             |
| FP            | Placa de piso   |
| GABA          | Acido gamma aminobutírico                                       |
| GDNF          | Factor neurotrófico derivado de la glía                         |
| GDNF-ESC      | Células troncales embrionarias de ratón GDNF                    |
| GFR- $\alpha$ | Familia de receptores a GDNF $\alpha$                           |
| GIRK2         | Canal 2 de potasio rectificador interno activado por proteína G |
| GPe           | <i>Globulus pallidus</i> externo                                |
| GPi           | <i>Globulus pallidus</i> interno                                |
| Gsk3 $\beta$  | Glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$                              |
| hESC          | Células troncales embrionarias humanas                          |
| HPLC          | Cromatografía líquida de alta eficacia                          |
| hPSC          | PSC humanas   |
| ICM           | Masa celular interna  |
| iMEF          | Fibroblastos embrionarios de ratón irradiados                   |
| iPSC          | Células troncales pluripotentes inducidas                       |
| ITS           | Insulina-Transferrina-Selenito                                  |
| L             | Lateral   |
| L-DOPA        | L-3,4 dihidroxifenilalanina                                     |
| LIF           | Factor inhibidor de la leucemia                                 |
| MAOB          | Monoamina oxidasa tipo B  |
| MAPK          | Proteínas cinasas activadas por mitógenos                       |
| mESC          | Células troncales embrionarias de ratón                         |

|       |   |
|-------|---|
| mPSC  | PSC provenientes de ratón   |
| MPTP  | 1-methyl-4-phenil-2,2,3,6-tetrahydropyridine                        |
| mRNA  | Ácido ribonucleico mensajero  |
| MV    | Mesencephalo ventral  |
| NCAM  | Molécula de adhesión de células neurales                            |
| NDas  | Neuronas dopaminérgicas   |
| NF    | Neurotrofinas   |
| NTF   | Factores neurotróficos  |
| NTRN  | Neurturina  |
| OCT4  | Factor de transcripción de unión a octámeros 4                      |
| PCR   | Reacción en cadena de la polimerasa                                 |
| PET   | Tomografía por emisión de positrones                                |
| PrE   | Endodermo primitivo   |
| PSC   | Células troncales pluripotenciales                                  |
| qPCR  | Cadena en reacción de la polimerasa-Retrotranscripción cuantitativa |
| SHH   | Sonic hedgehog  |
| SNcp  | <i>Substantia nigra pars compacta</i>                               |
| SNr   | <i>Substantia nigra pars reticulata</i>                             |
| SSEA  | Antígenos embrionarios específicos de etapa                         |
| STN   | Núcleo subtalámico  |
| TGFβ  | Factor de crecimiento transformante beta                            |
| TH    | Tirosina hidroxilasa  |
| VMAT2 | Transportador vesícula de monoaminas                                |
| VTA   | Área tegmental ventral  |

## V. INTRODUCCIÓN

### 5.1 Células troncales pluripotenciales

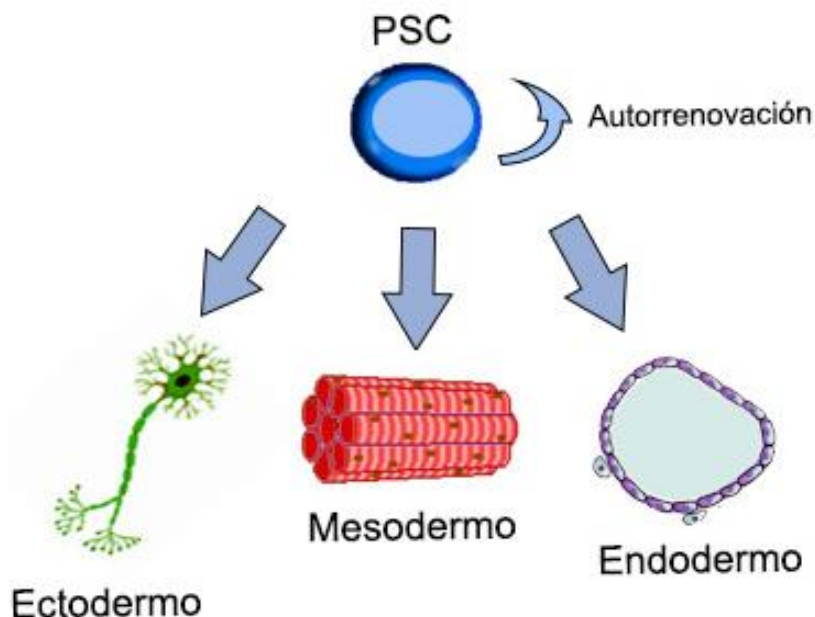
#### 5.1.1 Tipos y características de las células troncales pluripotenciales

Una célula troncal (SC por sus siglas del inglés “*Stem Cell*”) es una célula indiferenciada o inmadura que posee dos propiedades determinantes: la autorrenovación y la diferenciación. La primera propiedad se refiere a que puede generar una célula con las mismas características al dividirse a sí misma. La segunda se refiere a que, al ser inmadura, puede especificarse o determinarse a un tipo celular altamente especializado. Si bien todas las SCs pueden autorrenovarse y diferenciarse, el potencial de diferenciación puede variar dependiendo del grado de especialización de la célula o su origen (Morrison and Kimble, 2006).

Las células totipotenciales son aquellas que pueden generar un individuo completo, incluyendo los tejidos extraembrionarios; sin embargo, estas células no son consideradas SCs ya que no se ha demostrado que éstas tengan la capacidad de autorrenovarse. Las células troncales con una mayor capacidad de diferenciación son las células troncales pluripotenciales (PSC, por sus siglas del inglés *Pluripotent stem cells*), las cuales pueden dar origen a cualquier célula de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo (Figura I) (McCulloch and Till, 2005; González et al., 2017). Este tipo de células forman colonias compactas, delimitadas, con células pequeñas refringentes y con una relación núcleo/citoplasma elevada. Expresan factores transcripcionales que están asociados a la pluripotencia, tales como OCT4, SOX2 y NANOG; además, expresan marcadores de superficie asociados a un estadio indiferenciado y que permiten la diferenciación entre líneas de PSC provenientes de ratón (mPSC) o de humano (hPSC). Otras características importantes de estas PSC son los altos niveles de actividad de telomerasa (Wright et al., 1996), la capacidad de formar teratomas al ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos (Doetschman et al., 1985; Itskovitz-Eldor et al., 2000) y de poder contribuir a la línea germinal durante la formación de quimeras (Takahashi and Yamanaka, 2006), aunque en las líneas de hPSC solo se han reportado pocos casos y con resultados no muy claros, en donde las imágenes de los embriones a los 19 días post fecundación no mostraba una morfología clara del embrión y, además, las hPSC no mostraron una clara contribución al embrión a partir de los 13 días post fecundación (Wu et al., 2017; Tan et al., 2021). Cabe señalar que a estos organismos no se les permitió continuar con su desarrollo más allá de las 20 semanas post fecundación debido a cuestiones éticas y, por lo tanto, conocer la capacidad de formar quimeras de las células humanas sigue siendo una incógnita.

La primer línea de PSC creada fue una línea de carcinoma embrionario, generada a partir del aislamiento de teratomas de ratones capaces de generar tejidos de las tres capas embrionarias (Kleinsmith and Pierce, 1964; Martin and Evans, 1974). Algunos años después

se describieron otros tipos de células pluripotentes como las células troncales embrionarias (ESC, por sus siglas del inglés *embryonic Stem cells*) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas del inglés *induced pluripotent Stem cells*) las cuales poseen un cariotipo más estable (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson, 1998; Andrews, 2002; Takahashi and Yamanaka, 2006; Lensch and Mummery, 2013).



**Figura I. Características de las células troncales pluripotentes (PSC).** Las PSC son capaces de generar células de las tres capas embrionarias como el ectodermo, representado por una neurona; el mesodermo, representado por células musculares esqueléticas; y el endodermo, representado por células de la glándula tiroidea. También tiene capacidad de autorrenovación, manteniendo la población de PSC.

### 5.1.2 Características de las células troncales embrionarias

Las ESC son líneas celulares que son pluripotentes, inmortales y con un cariotipo diploide normal aún después de mantenerse en cultivo por tiempo prolongado (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Amit et al., 2000). Son generadas a partir de la expansión *ex vivo* de la masa celular interna (ICM, por sus siglas del inglés *inner cell mass*) del blastocisto, la cual es una estructura que contiene una mezcla heterogénea de células que darán lugar a una estructura de soporte del embrión como lo es el endodermo primitivo (PrE, por sus siglas del inglés *primitive endoderm*) y al epiblasto (Epi) que formará al futuro organismo. El primer tipo de ESC obtenidas fueron las ESC de ratón (mESC) (Evans and Kaufman, 1981; Wu and Izpisua Belmonte, 2015), las cuales, junto a la obtención de las ESC de primates no humanos (Thomson et al., 1995), sentaron las bases para el mantenimiento en cultivo de ESC provenientes de blastocistos humanos (hESC) (Thomson, 1998), siendo muy similares las mESC y las ESC de primate en cuanto a la mayoría de las características de PSC, aunque teniendo una diferencia en la expresión de marcadores de superficie, siendo SSEA-1 (del

inglés *Stage-Specific Embryonic Antigen 1*) expresado en las mESC y SSEA-3 o SSEA-4 en las células de primate, además de que estas expresan el marcador TRA-1-60 y TRA-1-81 (Thomson et al., 1995; Zhao et al., 2012).

Durante el desarrollo, la ICM contiene progenitores del Epi y del PrE que están comprometidos a un proceso de diferenciación, por lo que se considera que este estado de pluripotencia solo es transitorio, además de que su autorrenovación es limitada (Andrews, 2002). En cultivo las ESC pueden mantener la pluripotencia y la autorrenovación mediante la señalización adecuada, por lo que la mayor parte de los protocolos de cultivo se basa en mejorar la expansión de estas células y mantener la pluripotencia utilizando moléculas pequeñas o el co-cultivo con otros tipos celulares. Tanto las mESC como las hESC pueden ser mantenidas en una capa de fibroblastos embrionarios de ratón que fueron inhibidos mitóticamente (iMEF, por sus siglas del inglés *mouse embryonic fibroblasts*), también conocidos como *feeders* o células alimentadoras (Martin and Evans, 1974, 1975; Bongso et al., 1994); sin embargo, este método de cultivo ha estado en desuso ya que representaba el uso de un tipo celular contaminante que limitaba el potencial uso de estas células en la terapia celular, por lo que nuevos métodos se han desarrollado para el mantenimiento de la pluripotencia de las ESC en cultivo.

Las mESC pueden ser mantenidas en condiciones de cultivo libres de iMEF usando una combinación del factor inhibidor de leucemia (LIF, por sus siglas del inglés *Leukemia inhibitory factor*), el cual induce la inhibición de proteínas de diferenciación y dos moléculas pequeñas: el CHIR99021, el cual es un inhibidor de la proteína glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (Gsk3 $\beta$ ) y PD184352, un inhibidor de la vía de Mek/Erk, la cual induce la diferenciación (Ying et al., 2008). A esta combinación de factores se le conoce como 2i/LIF y permite tener una población de células con características muy similares a las observadas en las PSC encontradas en el blastocisto temprano, es por esto por lo que se les conoce como estado “naive” (Huang et al., 2014; Wu and Izpisua Belmonte, 2015; Stirparo et al., 2018). Las ESC que están más comprometidas a la diferenciación y que se encuentran en un estado de pluripotencia similar al de las células troncales pluripotentes del epiblasto (EpiSCs, por sus siglas del inglés *Epiblast Stem Cells*), también conocidas como células en estado “primed”, son mantenidas con otro tipo de medio que requiere de Activina y el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2, por sus siglas del inglés *Fibroblast growth factor-2*), los cuales son factores que se suelen usar para el mantenimiento de las hESC en cultivo (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), aunque trabajos recientes han demostrado que también ser mantenidas en un estado “naive” (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Bayerl et al., 2021).

### **5.1.3 Células troncales pluripotenciales y su uso en investigación**

La capacidad de autorrenovación y de poder diferenciarse hacia cualquier linaje deseado ha llamado la atención de varios investigadores por su uso potencial como una herramienta en la investigación biomédica básica y la medicina regenerativa. Estas células han servido como modelo de los procesos de diferenciación, morfogénesis y organogénesis (Doetschman et

al., 1985; van den Brink et al., 2014; Turner et al., 2016; Simunovic and Brivanlou, 2017), cuyo entendimiento era limitado debido a las complicaciones metodológicas de la época. Otros estudios con estas células permitieron determinar y caracterizar los factores de transcripción que son reguladores del desarrollo temprano y que mantienen el estado pluripotencial en ESC (Chambers, 2004), siendo OCT4 el primero en ser descrito como un factor maestro de la pluripotencia (Nichols et al., 1998; Hay et al., 2004), después se encontró que tanto los factores de transcripción NANOG y SOX2 son requeridos para mantener a las células en este estadio (Chambers et al., 2003; Boyer et al., 2005; Orkin, 2005). Estos descubrimientos darían posteriormente las bases para la generación de las iPSC ya que la inducción de la pluripotencia en células somáticas requiere la expresión de estos factores de transcripción junto con otros transcritos como *c-Myc* y *Klf4* (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). En un gran número de trabajos se ha comprobado que la diferenciación de ESC puede ser controlada *in vitro* usando diferentes factores para enriquecer un tipo celular específico de alguna de las capas germinales, mostrando así, gran potencial para su uso en la terapia celular y medicina regenerativa. De manera resumida se muestran en la Tabla 1 algunos de los diferentes protocolos de diferenciación que se han generado empleando ESC.

**Tabla 1.** Protocolos de diferenciación usando ESC.

| Tipo celular                   | Referencias  |
|--------------------------------|--|
| Cardiomiocitos                 | (Klug et al., 1996; Shafa et al., 2011; Mummery et al., 2012)                                  |
| Células de la retina           | (Osakada et al., 2008; Aoki et al., 2009; Mehat et al., 2018)                                  |
| Células endoteliales           | (Hirashima et al., 1999; Yamashita et al., 2000; Jezierski et al., 2007; Harding et al., 2017) |
| Células germinales             | (Hübner et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Geijsen et al., 2004; Lacham-Kaplan et al., 2006)  |
| Células hematopoyéticas        | (Nakano et al., 1994; Kennedy et al., 1997; Pearson et al., 2015)                              |
| Células secretoras de insulina | (Soria et al., 2000; Lumelsky et al., 2001; Zhang et al., 2009)                                |
| Hepatocitos                    | (Agarwal et al., 2008; Hay et al., 2008)   |
| Motoneuronas                   | (Lee et al., 2007; Soundararajan et al., 2007; Cortés et al., 2016)                            |
| Neuronas dopaminérgicas        | (Lee et al., 2000; Kriks et al., 2011; Kirkeby et al., 2017)                                   |
| Oligodendrocitos               | (Liu et al., 2000; Nistor et al., 2005)  |
| Precursores neurales           | (Brüstle et al., 1997, 1999)   |

Estos protocolos de diferenciación también constituyen herramientas para pruebas farmacológicas dirigidas a tipos celulares específicos, usándolas incluso como vectores de administración de moléculas con actividad biológica. Esto es importante debido a que los modelos actuales requieren del uso de animales que son más complicados de manipular y más costosos, por lo que el uso de modelos farmacológicos basados en cultivos celulares es cada vez más necesario.

Finalmente, el mayor potencial de estas células se encuentra en su uso en la medicina regenerativa, pues estas células al ser diferenciadas a múltiples tipos celulares podrían sustituir la función de algún órgano o tejido que haya sido dañado. Incluso, se han utilizado células diferenciadas de ESC como vehículos para dar soporte trófico a algún tejido u órgano, sin la necesidad de sustituir su función, lo que hasta ahora ha demostrado ser una tarea más complicada (Deb and Sarda, 2008; Shi et al., 2017). En la Tabla 2 se muestra de forma resumida el uso de células diferenciadas de ESC en algunos modelos animales.

**Tabla 2.** Uso de células diferenciadas de ESC en modelos animales.

| Tipo celular                     | Modelo animal   | Referencias  |
|----------------------------------|---|--|
| Cardiomiocitos                   | Muerte inducida del miocardio en ratas                                  | (Kehat et al., 2004; Caspi et al., 2007; Christoforou et al., 2010)                      |
| Condrocitos                      | Defecto osteocondral en ratas   | (Hwang et al., 2008; Cheng et al., 2014)   |
| Células de la retina             | Degeneración macular en roedores  | (Cho et al., 2012; Mehat et al., 2018)   |
| Células endoteliales             | Ratón y lesión arterial en primates no humanos                          | (Shi et al., 2013; Sriram et al., 2015)  |
| Células secretoras de insulina   | Ratones diabéticos inducidos por streptozotocina                        | (Shim et al., 2007; Bose et al., 2012)   |
| Hepatocitos                      | Lesión hepática inducida por alcohol y hepatectomía en ratones          | (Yin et al., 2002; Wang et al., 2019)  |
| Motoneuronas                     | Ratones hemipléjicos y ratas con lesión motora                          | (Harper et al., 2004; Ikeda et al., 2004)  |
| Neuronas dopaminérgicas          | Ratas, ratones y primates no humanos lesionados en el estriado          | (Lee et al., 2000; Kriks et al., 2011; Díaz-Martínez et al., 2013; Kirkeby et al., 2017) |
| Progenitores de oligodendrocitos | Lesión de espina dorsal en ratones y Leucodistrofia globular en ratones | (Keirstead et al., 2005; Nakamura et al., 2005; Kuai et al., 2015)                       |
| Precursores neurales             | Enfermedad de Huntington y accidente cerebrovascular en roedores        | (Bühnemann et al., 2006; Vazey et al., 2006; Song et al., 2007)                          |

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que representa el uso de estas células en la medicina, aún hay varios inquietudes que tienen que ser resueltas como el potencial tumorigénico de las ESC y el rechazo del injerto por parte del receptor del trasplante; además, las técnicas de manipulación deben ser mínimas y se debe evitar el uso de co-cultivos con cualquier otro tipo celular, evitando también el uso de medios con sueros de origen no humano y promoviendo el uso de medios que sean químicamente definidos (Ohnuki and Takahashi, 2015; Doğan, 2018; Rajabzadeh et al., 2019).

## **5.2 Terapia de reemplazo celular en la enfermedad de Parkinson**

### **5.2.1 Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en personas mayores de 60 años a nivel mundial. Hasta ahora se desconoce cuál es la etiología de la enfermedad, incluso se ha llegado a creer que probablemente no exista una sola causa y que la EP, de hecho, no es una enfermedad en el estricto sentido de la palabra, sino más bien un síndrome con múltiples etiologías (Poewe et al., 2017). Existen dos clasificaciones de esta enfermedad de acuerdo con su naturaleza: Parkinson esporádico (95% de los casos), en el cual la muerte de las neuronas dopaminérgicas (NDas) es esporádica y se asocia a múltiples factores ambientales e intrínsecos de la célula, como el estrés oxidativo o la falla en la autofagia (Tanner et al., 2009; Stacy et al., 2011) y Parkinson genético (5% de los casos), el cual se atribuye a una predisposición genética relacionada a mutaciones en los locus *PARK-SNCA*, *PARK-Parkin*, *PARK-PINK1*, *PARK-VPS35* y *PARK-DJ1* (Bonifati et al., 2003; Dauer and Przedborski, 2003; Poewe et al., 2017).

### **5.2.2 Síntomas en la EP**

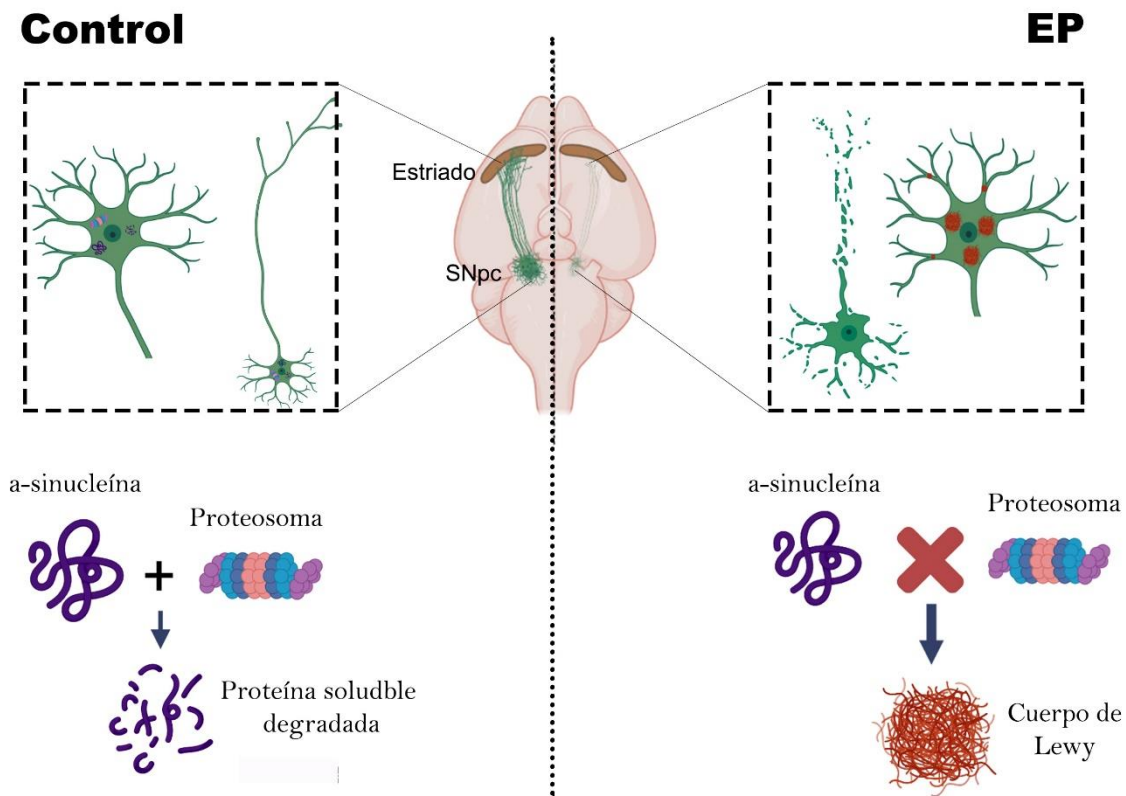
Se identifican, tradicionalmente, cuatro síntomas fundamentales en la EP: temblor en reposo, rigidez o resistencia a iniciar movimientos voluntarios, bradicinesia o lentitud al realizar movimientos e inestabilidad en la postura, aunque este último no está asociado a la disminución de dopamina (DA) en el estriado (Dauer and Przedborski, 2003; Parmar, 2018). Existen otros síntomas que, si bien no se presentan en todos los pacientes con esta enfermedad, se asocian a estadios avanzados de la enfermedad como la acinesia (ausencia de movimientos), la hiponimia (disminución en la expresión facial), hipocinesia (reducción en la amplitud del movimiento), demencia causada por cuerpos de Lewy y depresión. Sin embargo, en los últimos años se han realizado varios estudios en los cuales se demuestra que hay síntomas tempranos asociados a la enfermedad y que podría ser usados como marcadores para la detección de la EP antes de la aparición de los síntomas motores. Algunos de estos síntomas son: pérdida del olfato, desorden del sueño, constipación, nocturnia entre otros (Goldman and Postuma, 2014). Es de suma importancia aclarar que ninguno de estos síntomas está relacionado con la pérdida de DA en el estriado, la cual es una característica importante en esta enfermedad.

### **5.2.3 Características fisiopatológicas de la EP**

La característica principal de esta enfermedad es la degeneración de las NDas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) con la concomitante denervación del estriado dorsal y, por consecuente, la disminución de los niveles de DA en este núcleo de cerebro. Los síntomas motores de la enfermedad aparecen cuando hay una disminución del 80% de las terminaciones dopaminérgicas en el estriado y un 60-80% de los somas en la SNpc (Dauer and Przedborski, 2003; Poewe et al., 2017), sugiriendo que la pérdida de las NDas sucede antes de comenzar los síntomas motores haciendo que esta enfermedad sea difícil de



diagnosticar en etapas tempranas (Dijkstra et al., 2014; Iacono et al., 2015). Otra característica fisiopatológica de la enfermedad es la aparición de agregados de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina conocidos como cuerpos de Lewy, los cuales se acumulan en el citoplasma de las neuronas en varias regiones del cerebro. Durante la EP, la  $\alpha$ -sinucleína soluble comienza a tener plegamientos anormales, permitiendo la formación de oligómeros. Eventualmente, estos oligómeros dan lugar a la formación de protofibrillas pequeñas que se acumulan en el citoplasma y al no ser procesadas por los mecanismos comunes de eliminación de proteínas mal plegadas. Finalmente, se forman fibrillas grandes e insolubles de  $\alpha$ -sinucleína, las cuales provocan una inhibición del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma y de la macroautofagia (Figura II) (Emmanouilidou et al., 2010; Winslow et al., 2010; Tanik et al., 2013; Melki, 2015). Los mecanismos por los cuales estos agregados proteicos generan la muerte de las NDAs en la EP aun no son claros, pero algunas investigaciones los asocian con un incremento en la función mitocondrial y el aumento en las especies reactivas de oxígeno (Devi et al., 2008; Park et al., 2018; Malpartida et al., 2021).



**Figura II. Fisiopatología de la EP.** Se muestra un modelo animal de la EP. De lado izquierdo, se observa la vía nigroestriatal que va desde la SNpc hasta el estriado con abundantes proyecciones; en el cuadro, se muestra una representación de la morfología de las NDAs, con axones sanos y somas con un sistema de eliminación de proteínas funcionando. En el panel inferior izquierdo, se representa la eliminación de la  $\alpha$ -sinucleína cuando el sistema del proteasoma funciona (uno de los varios métodos de eliminación de proteínas) y no hay acumulación de agregados proteicos. De lado derecho, se muestra la vía nigroestriatal en un modelo de la EP, en donde el número de somas en

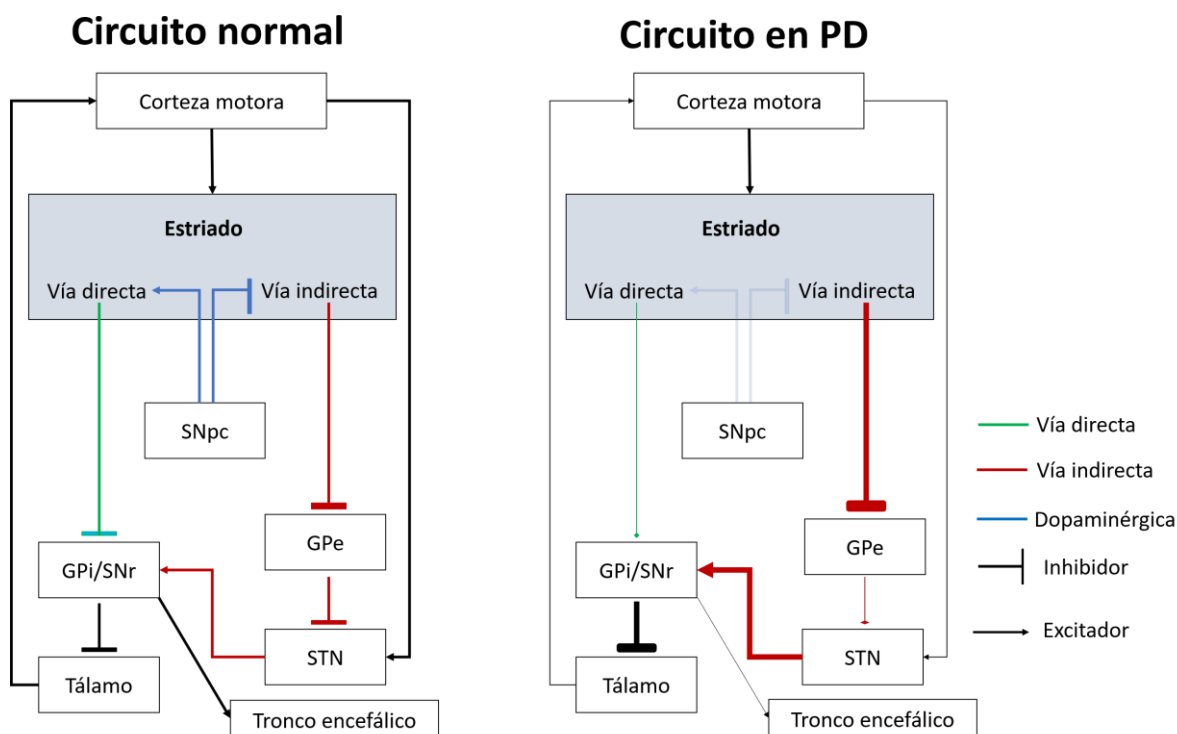
la SNpc se ve disminuido y las proyecciones hacia el estriado también están reducidas; en el cuadro, se muestra una representación de la morfología de las NDAs durante la EP, se observan axones y somas en degradación con clara muerte celular y la aparición de agregados proteicos en el soma, dendritas y terminaciones axonales. En el panel inferior derecho, se representa la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína debido a fallas en el sistema de degradación de proteínas y, por consiguiente la formación de cuerpos e Lewy.

#### 5.2.4 Patofisiología de los circuitos neuronales durante la EP

La reducción de las proyecciones axonales de las NDAs al estriado genera una reducción en los niveles de DA en este núcleo del cerebro, generando un desbalance en el circuito corticoestriatal. Este circuito está anatómicamente caracterizado por las salidas u “*outputs*” que se encuentran en el estriado, generando una señal que pasa por varios núcleos hasta llegar a la corteza motora. A su vez, el estriado recibe entradas o *inputs* directamente de la corteza motora y de la SNpc, generando un sistema de regulación influenciado directamente por la DA liberada en las entradas del estriado (Nambu et al., 2000; Gradinaru et al., 2009; Poewe et al., 2017). La EP resulta de la reducción en la transmisión dopaminérgica debido a la reducción de la DA, la cual funciona como un regulador en el proceso de señalización, al actuar como un modulador de señales de excitabilidad en corto plazo, así como modeladora de cambios a largo plazo en la fuerza sináptica que controla la actividad del circuito. Estos cambios en los niveles de DA generan un cambio en el comportamiento de las neuronas que se encuentran en los ganglios basales, mostrando una sincronización anormal en sus disparos y desregulando la señal enviada a la corteza motora, lo cual genera los síntomas motores de la EP (Gradinaru et al., 2009).

El circuito motor es formado por proyecciones de la corteza motora primaria, la corteza motora suplementaria y la corteza premotora, teniendo una de sus salidas y relevos en las neuronas espinales medianas del estriado. De aquí surgen dos vías: la vía directa y la vía indirecta. La vía directa consiste en una conexión sináptica entre las neuronas espinosas mediales que expresan el receptor de dopamina D1 y las neuronas ácido gamma-aminobutíricas (GABAérgicas, por sus siglas del inglés *gamma-aminobutyric acid-ergic*) en el *Globulus pallidus* internos (GPi) y la *substantia nigra pars reticulata* (SNr). Estos ganglios basales tienen salidas que proyectan al tronco encefálico y al tálamo ventrolateral. La vía indirecta se origina en las neuronas espinales medianas que expresan el receptor a DA D2, las cuales proyectan hacia el *Globus pallidus* externo (GPe), teniendo otra salida que conecta con el núcleo subtalámico (STN) como una conexión glutamatérgica. Es a través de estas vías que la DA en el estriado regula la actividad GABAérgica de los ganglios basales. Finalmente, el tálamo ventral tiene una salida que proyecta a la corteza motora, la cual es regulada de forma positiva por las neuronas espinales de esta región (Psiha and Vlamos, 2015). Durante la EP, los cambios en la liberación de DA asociados a la muerte de las NDAs provocan un desbalance en la actividad de los ganglios basales, provocando un incremento en la actividad de la vía indirecta y una disminución en la actividad de la vía directa. Ésto se

ve reflejado en un incremento en la inhibición del tálamo ventral, dando como resultado un decremento en la señalización de esta estructura hacia la corteza motora (Gradinaru et al., 2009; Surmeier et al., 2011; Shepherd, 2013). Existe una tercer vía, a la cual se le conoce como la vía hiperdirecta, que va desde la corteza motora hasta el STN, regulando así a la SNr y el GPi; sin embargo, esta vía no se ve afectada durante la EP, ya que su actividad no repercute en el incremento de la señalización en el GPi/SNr dado por el STN (Figura III).



**Figura III. Circuito corticoestriatal en la EP.** Se muestran los ganglios basales que conforman la vía corticoestriatal. En la izquierda, las entradas y salidas de los diferentes ganglios en un cerebro con funcionamiento normal. La SNpc proyecta al estriado, provocando la activación de la vía directa y la inhibición de la vía indirecta. Ambas vías hacen relevo en otros núcleos para regular la actividad del tálamo, el cual regula de forma directa a la corteza motora. En la derecha, la vía en un modelo de la EP. Al haber disminución de DA en el estriado, la vía directa ve disminuida su actividad y la vía indirecta incrementa su actividad, dando lugar a un incremento en la inhibición del GPe, lo cual se ve reflejado en el incremento de la actividad del STN. Esto provoca que la actividad del GPi/SNr aumente y, por lo tanto, lleve a un incremento en la inhibición del tálamo. Finalmente, la actividad de la corteza motora disminuye.

Es debido a la depleción de dopamina que estos circuitos se ven alterados, dando lugar a que mucha de la investigación dirigida al tratamiento de esta enfermedad sea encaminada a la reposición de DA en el estriado. Se han propuesto también tratamientos usando la regulación de los ganglios basales como otra alternativa al tratamiento de la enfermedad (Poewe et al., 2017).

### 5.2.5 Tratamientos para la EP

Como se mencionó previamente, los tratamientos más comunes para la EP se basan en el restablecimiento de los niveles de DA en el estriado mediante el uso de ciertos fármacos, pero hoy en día existen más alternativas al tratamiento de dicha enfermedad incluyendo el uso de fármacos que regulan la transmisión dopaminérgica nigroestriatal, agonistas de la DA o el uso de factores que promuevan la supervivencia de las NDAs que aún permanecen en la SNpc.

### 5.2.5.1 Tratamientos farmacológicos

Dentro de los tratamientos farmacológicos, la levodopa o L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es el fármaco que más se ha utilizado para mitigar los síntomas de la EP; sin embargo, la L-DOPA tiene varias complicaciones en etapas tardías de la enfermedad como la aparición de discinesias que varían en intensidad y frecuencia. Aunado a esto, este fármaco funciona de manera eficaz los primeros años de su administración, pero conforme la enfermedad va avanzando la eficacia va disminuyendo y se van adicionando problemas relacionados a su administración (Olanow et al., 2006; Cenci, 2014; Olanow, 2015). Cuando este medicamento es metabolizado y logra restablecer los niveles de DA en el estriado se le conoce como efecto “On”, provocando que los síntomas de la EP disminuyan; sin embargo, cuando este efecto concluye y los niveles de DA bajan hasta reactivar los síntomas se pasa a un estado “Off”. Además, se han observado respuestas neuronales irregulares causadas por la desensibilización de los receptores de DA cuando la L-DOPA es administrada por periodos largos de tiempo, teniendo que ajustarse la dosis continuamente (Olanow et al., 2006). Aunado a lo anterior, la L-DOPA puede ser metabolizada antes de llegar al encéfalo cuando es administrada debido a que es absorbida por el sistema gastro-intestinal antes de pasar la barrera hematoencefálica, es por esto por lo que hoy en día es administrada con inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), inhibidores de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) e inhibidores de la monoamina oxidasa tipo B (MAOB), que son enzimas que pueden metabolizar a este fármaco (Poewe et al., 2017).

Otro tipo de tratamiento farmacológico es el uso de agonistas de DA, los cuales van dirigidos a la activación de los receptores, principalmente los receptores tipo D2. Estos agonistas, como el Pramipexol, tienen la ventaja de tener una vida media mayor a la L-DOPA y son convenientes para pacientes con fluctuaciones a la respuesta de L-DOPA, además de que no generan desensibilización de los receptores, reduciendo así el riesgo de generar complicaciones motoras; sin embargo, debido a su naturaleza estructural, estos agonistas también tienen afinidad por los receptores D3 que se encuentran en el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas del inglés *ventral tegmental area*), causando una estimulación excesiva en el sistema de recompensa del cerebro, además de generar efectos secundarios como somnolencia y trastornos del control de impulsos (Voon et al., 2011).

Existen nuevos tratamientos farmacológicos que se enfocan en la neuroprotección de las NDAs remanentes de la SNpc. Para esto se emplea la infusión de factores neurotróficos (NTF del inglés *neurotrophic factors*) y neurotrofinas (NF) que han sido utilizados en pruebas

clínicas, mostrando resultados positivos en modelos animales de la EP y pruebas en fase 1 (Gill et al., 2003; Slevin et al., 2005; Lang et al., 2006); sin embargo, en pruebas clínicas en fase 2 los resultados son muy variables y no todos los pacientes mostraron mejora en los síntomas motores (Whone et al., 2019b, 2019a). Esto se puede deber a que estas moléculas tienen algunas limitaciones farmacológicas como su corta vida media, baja capacidad al traspasar la barrera hematoencefálica y la aparición de efectos secundarios generados por mecanismos de compensación (Tenenbaum and Humbert-Claude, 2017).

### **5.2.5.2 Estimulación profunda del cerebro**

La estimulación profunda del cerebro (DBS por sus siglas del inglés *Deep brain stimulation*) es otra alternativa para tratar esta enfermedad, la cual se basa en la estimulación de los ganglios basales para regular el desorden motor en la EP. Dicha estimulación se da lesionando algunos de los ganglios basales como el STN o el GPi, los cuales regulan la actividad del tálamo introduciendo un electrodo en el tejido cerebral (Jankovic and Poewe, 2012). De forma interesante, este tratamiento es considerado como el que menos efectos secundarios genera y el que reduce de manera significativa todos los síntomas de la EP, además de que reduce la dosis necesaria de L-DOPA y provoca la disminución de discinesias inducidas por la administración del fármaco; sin embargo, no todos los pacientes con EP son candidatos a este tratamiento debido al riesgo quirúrgico que representa y al progreso de la enfermedad, siendo los pacientes con Parkinson avanzado los que más se someten a este tratamiento al ser mayor el beneficio que el riesgo de desarrollar efectos adversos (Engel et al., 2018). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la muerte por cirugía solo se ha dado en el 0.4% de las intervenciones y solo el 3.4% mostraron complicaciones intracraneales tales como hemorragias o infecciones, siendo esto un indicativo de que, incluso en pacientes con síntomas menos severos, el beneficio de este tratamiento es mayor que el riesgo de generar complicaciones post operatorias (Krack et al., 2019).

### **5.2.5.3 Terapia génica**

La terapia génica es una de las estrategias para el tratamiento de la EP, que utiliza vectores virales para la expresión de factores de crecimiento o enzimas que sintetizan neurotransmisores. De la primera estrategia y se ha hablado en la sección “Tratamientos farmacológicos”, haciendo mención del uso de los NTF y NF como tratamiento de la EP. La segunda estrategia utiliza los vectores virales (lentivirus o virus adenoasociados) que expresan tirosina hidroxilasa (TH) la enzima limitante en la síntesis de DA, además de cofactores y la AADC (Mittermeyer et al., 2012; Palfi et al., 2014). La idea en general es que las células del estriado sean capaces de sintetizar la DA localmente, ya sea por la actividad de la TH o por la administración de L-DOPA o DA (Jankovic and Poewe, 2012). Otra aproximación con esta estrategia es el uso de estos vectores para la expresión de la descarboxilasa del ácido glutámico en el STN para incrementar los niveles basales de GABA e inhibir la actividad de este núcleo (LeWitt et al., 2011).

#### 5.2.5.4 Terapia de reemplazo celular para el tratamiento de la EP

Si bien los tratamientos anteriores han mostrado ser eficaces en ensayos clínicos y modelos animales, ninguno de ellos se enfoca en el problema principal de la EP: la pérdida de las NDAs y la consecuente denervación del estriado. Es por ésto que la estrategia de terapia de reemplazo celular ha tomado fuerza en los últimos años, la cual se define como el uso de células para reponer tejidos o células dañadas durante una lesión envejecimiento o enfermedad. En el caso de la EP, se han utilizado NDAs de diferentes fuentes para mejorar los síntomas motores, al restaurar los niveles de DA en el estriado (Brundin et al., 2010; Barker et al., 2015).

La primer fuente de obtención de NDAs fue el mesencéfalo ventral (MV) de fetos humanos abortados, las cuales se han utilizado en varios ensayos clínicos, mostrando una disminución en los síntomas de la enfermedad, además de la supervivencia de estas neuronas trasplantadas por 20 años en algunos casos, aunque estos pacientes seguían mostrando síntomas de la enfermedad (Lindvall and Björklund, 2004; Hallett et al., 2014). También se ha encontrado en tejidos *postmortem* la presencia de algunas NDAs, junto con un incremento en la inervación en el estriado (Li et al., 2016), aunque esta inervación y el número de células que sobreviven no parecen ser suficiente para mitigar los síntomas de la enfermedad a largo plazo. Estos resultados han sido variables en varios ensayos clínicos, en donde la edad de los pacientes parece ser fundamental, así como en la etapa de la enfermedad en la que recibieron dicho trasplante (Kordower et al., 1995b; Olanow et al., 1996); además, varios pacientes han mostrado efectos secundarios adversos como la aparición de movimientos involuntarios. Otra gran limitante para el uso de estas NDAs provenientes de tejido MV es que se requieren de entre 3 a 5 fetos abortados para obtener un número suficiente de células en un solo paciente, dando lugar a una heterogeneidad marcada y una escasez en la fuente de obtención de estas neuronas (Lindvall and Björklund, 2004).

Hoy en día es posible generar NDAs con características similares a las encontradas en el cerebro medio a partir de la diferenciación dirigida de ESC, aunque existen otras fuentes como la diferenciación dirigida de iPSC, la expansión y diferenciación de precursores neuronales, la diferenciación de células mesenquimales y la reprogramación neuronal directa de células somáticas a NDAs. En varias de estas estrategias se ha observado la recuperación conductual de animales lesionados, además de observar la supervivencia e inervación de las NDAs en el estriado de roedores adultos (Barker et al., 2015). La mayor inquietud con estos tipos de procedimientos es que los protocolos de diferenciación deben de ser altamente eficientes para no generar poblaciones celulares no deseadas o que tengan una alta capacidad de proliferación con la posibilidad de generar tumores; además, se ha propuesto que estas estrategias deben seguir la guía de la sociedad internacional para la investigación en células troncales (Turner, 2021), que incluye el uso de medios que cumplan los criterios de las buenas prácticas de manufactura y protocolos aprobados de

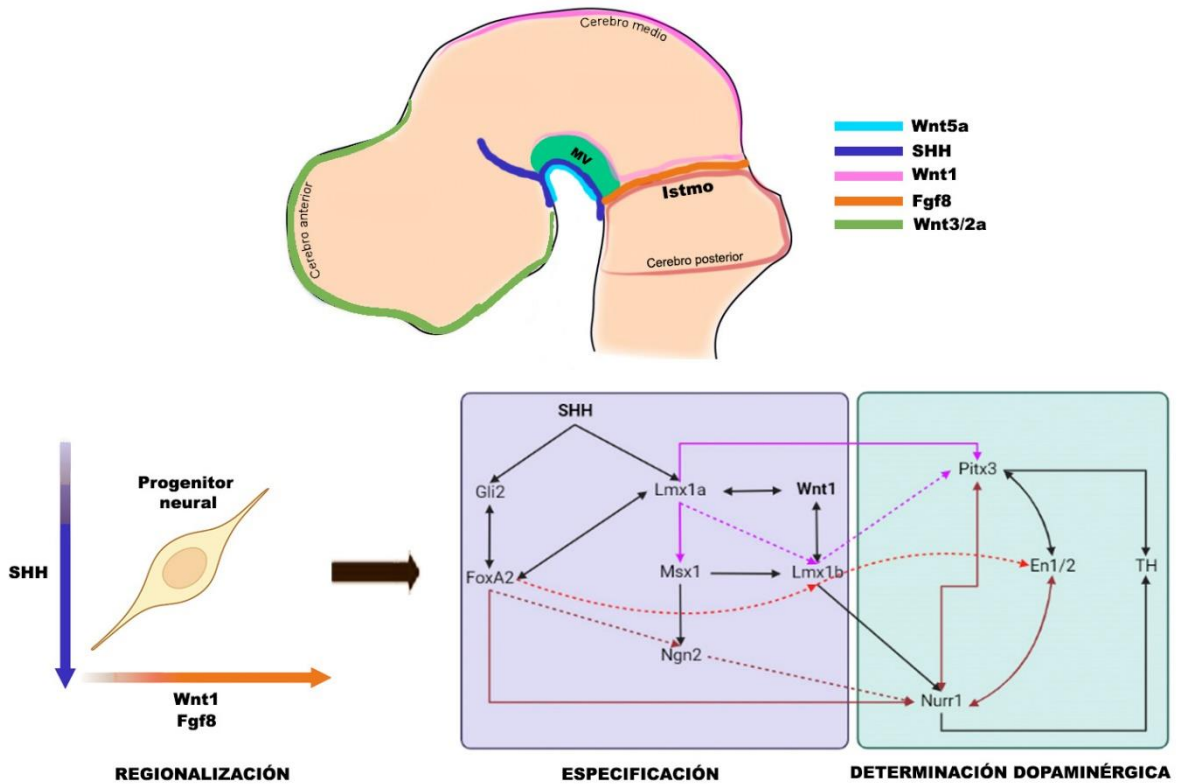
diferenciación que se hayan probado en ensayos preclínicos (Doi et al., 2014, 2020; Barker et al., 2017; Sun et al., 2021).

### 5.3 Diferenciación dirigida de NDAs a partir de ESC

Existen varios métodos para la obtención de NDAs a partir de ESC o PSC. En su gran mayoría, estos métodos tratan de mimetizar lo que ocurre durante el desarrollo embrionario, tratando de direccionar a estas células hacia la formación del ectodermo, para llegar a la obtención de precursores neurales y, finalmente, al linaje dopaminérgico. Los protocolos actuales de diferenciación dopaminérgica siguen utilizando este principio, por lo que hoy en día los esfuerzos se centran en aumentar la eficiencia de diferenciación para mantener poblaciones puras de NDAs con una menor proporción de otros tipos neuronales como las neuronas serotoninérgicas, las cuales también se generan en estos protocolos y que pueden generar efectos adversos en los trasplantes (Brundin et al., 2000; Carlsson et al., 2009; Lane et al., 2009). Para llegar a esto, tenemos que conocer las moléculas inductoras, las vías de señalización y la maquinaria transcripcional durante la especificación de la placa de piso del MV.

#### 5.3.1 Desarrollo temprano del MV

Durante el proceso de neurulación en los mamíferos, el neuroectodermo, que contiene células precursoras nerviosas, se hace más grueso y forma un epitelio cilíndrico denominado placa neural. Esta placa neural se cerrará mediante la unión de sus pliegues dorsales y formará el tubo neural que dará origen al encéfalo y la médula espinal. Las células que se encuentran en la línea media ventral del tubo neural se diferencian en una banda especial de células que parecen epiteliales y se denominan placa del piso (FP, por sus siglas del inglés *floor plate*), que proporcionan señales moleculares para especificar a los neuroblastos. Las células de la FP en la línea media ventral reciben la señal del morfógeno *Sonic hedgehog* (SHH), mientras que las células que se encuentran en la parte dorsal del tubo neuronal reciben la señal de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP, por sus siglas del inglés *bone morphogenic protein*). Estas señales determinan la polaridad dorsoventral del tubo neural e influyen además en la diferenciación de las células precursoras neurales. El eje anteroposterior del tubo neural es generado por la formación de un gradiente de ácido retinoico, Fgf y la proteína Wnt. La especificación del cerebro medio depende de un centro organizador localizado en el istmo, una estructura que se encuentra en una región adyacente al cerebro medio y que es capaz de inducir a las células contiguas a lo largo del eje anteroposterior mediante la expresión de Fgf8. Los morfógenos secretados por el istmo y la placa de piso dirigen a las células mesencefálicas hacia la diferenciación dopaminérgica (Gale and Li, 2008; Bond et al., 2012; Tao and Zhang, 2016). Las señales anteroposteriores por parte del istmo y del cerebro anterior, sumado a las señales dorsolaterales dadas por la notocorda y la placa de techo, generan la estructura conocida como MV (Figura IV) (Wang et al., 2020b).



**Figura IV. Desarrollo del mesencéfalo ventral.** En la imagen superior se muestran las diferentes regiones del encéfalo en desarrollo, las cuales expresan gradientes de morfógenos que darán forma e identidad a otras estructuras. El cerebro anterior se caracteriza por la expresión de Wnt3 y Wnt2a en la parte más anterior; se delimita con el cerebro medio mediante la expresión de SHH. El cerebro medio se caracteriza por la expresión del factor de transcripción Otx2 (no ilustrado en la imagen) y por la expresión de los morfógenos Wnt1 y Wnt5a; en la parte ventral del cerebro medio se forma el MV, el cual se delimita con el cerebro posterior por el centro organizador llamado istmo. Finalmente, el cerebro posterior comienza en la región del istmo, el cual expresa Fgf8, además de la expresión del factor de transcripción Nkx2.2 (no ilustrado en la imagen). En la parte inferior derecha de la imagen, se muestra la red transcripcional para la diferenciación dopaminérgica una vez que las señales de SHH, Fgf8 y Wnt llegan a los progenitores neurales (representada en la parte inferior izquierda). SHH induce la expresión de dos factores de transcripción importantes para la especificación mesencefálica: FoxA2 (vía la interacción con Gli2) y Lmx1a. Foxa2 regula la expresión de los factores de determinación dopaminérgica Nurr1 y Pitx3. Al primero lo regula de forma directa y mediante la interacción con el factor Ngn2 (líneas rojas punteadas) y al segundo solo de forma indirecta mediante la interacción de Nurr1 (línea roja). Lmx1a es regulado también por la expresión de Wnt1, este factor regula a los genes de especificación neural Msx1 y Ngn2, además de formar un bucle de regulación con Wnt1 y Lmx1b que ayuda a la especificación dopaminérgica; además, regula de forma directa al gen de determinación dopaminérgica Pitx3 (línea morada) y de forma indirecta mediante la interacción con Lmx1b (línea morada punteada). Nurr1 y Pitx3 regulan la expresión de TH y, a su vez, estos son regulados por En1/2, que es regulado por FoxA2, generando un bucle de autorregulación. MV: *mesencéfalo ventral*; SHH: *Sonic Hedgehog*; Fgf8: *Factor de crecimiento fibroblástico 8*.



### 5.3.2 Regulación genética en el desarrollo del MV

Después de la expresión de Fgf8 y SHH, se genera una cascada de señalización en la cual se ven involucrados varios factores de transcripción, los cuales inducen la formación de NDAs en el MV. Estos factores de transcripción son principalmente Ngn2, Otx2, Msx1, Lmx1a, Lmx1b Pitx3, En1, En2, FoxA2 y Nurr1. En la figura IV, se describen cómo es la interacción de estos factores transcripcionales para especificar a los precursores neurales a un destino mesencefálico ventral, para finalmente determinarse a NDAs que expresan TH. A continuación, se describirá de forma breve la función de cada factor:

**Ngn2:** Es un gen proneural, crucial para la regulación de la neurogénesis que es inducido por Msx1 y Otx2. Es expresado en progenitores dopaminérgicos mesencefálicos (Ang, 2006)

**Otx2:** En el sistema nervioso, su expresión está restringida al cerebro anterior y medio entre los estadios E8.5 y E12.5. Es requerido para el control y posicionamiento de la expresión de SHH y Fgf8, además de que su fallo en la expresión genera una profunda alteración en el código de identidad de los progenitores neurales en el MV (Puelles et al., 2004; Vernay et al., 2005; Omodei et al., 2008).

**Msx1:** Se encarga de la inhibición de factores de transcripción asociados al cerebro medio lateral; además, regula la expresión de Lmx1a y b, dando como resultado una alteración en el ciclo de autorregulación de los factores Lmx1 y Wnt1 (Failli et al., 2002; Andersson et al., 2006).

**Lmx1a y b:** Lmx1b es expresado en el cerebro medio en E8.0 en adelante, pero su expresión se restringe al día E.9.5 a la placa de piso, la frontera del cerebro medio-rombencéfalo y en la zona ventral del cerebro medio (Andersson et al., 2006). La expresión de Lmx1a se ha propuesto que marca el límite dorsal de los progenitores, mientras que la expresión inicial de Lmx1b incluye progenitores de otros tipos neuronales, específicamente neuronas serotoninérgicas (Dai et al., 2008; Wever et al., 2019). Juntos, Lmx1a y Lmx1b son factores que regulan los primeros pasos en la especificación de los precursores de las NDAs; además, varios estudios han demostrado que Lmx1a y Lmx1b trabajan de manera cooperativa para regular la proliferación de los precursores DA y la expresión de Ngn2 (Lin et al., 2009; Caiazzo et al., 2011; Wever et al., 2019).

**Pitx3:** En las NDAs comienzan a expresarse cuando llegan a su posición ventral final, sugiriendo que Pitx3 no está involucrado en el desarrollo temprano o migración de éstas. Es esencial para la inducción de la expresión de TH en las neuronas DA de la SNC, pero no del VTA. Contribuye al fenotipo de neurotransmisor de neurona DA del MV por medio de la inducción de la expresión del transportador de DA (DAT, por sus siglas del inglés DA

*transporter*) y el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2, por sus siglas del inglés *vesicular monoamine transporter 2*) (Hwang et al., 2009a).

En1/2: Se ha demostrado que una de sus principales funciones es la de prevenir la apoptosis en neuronas NDAs post-mitóticas para aumentar su supervivencia, siendo En1 el que se encuentra en todas las NDAs de la SNpc y VTA. Ambos genes tienen efectos tróficos y han sido involucrados en la regulación del gen y la proteína  $\alpha$ -sinucleína en NDAs (Hegarty et al., 2013).

FoxA2: Es el principal mediador de la señalización de Shh en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas. Regula el desarrollo de las NDAs e induce la neurogénesis a través de Ngn2. También, regula la diferenciación de NDAs mediante su interacción con Nurr1 y Pitx3, así como la promoción de la supervivencia de las NDAs. Se considera un factor de transcripción esencial para la identidad dopaminérgica ventral (Kittappa et al., 2007; Hegarty et al., 2013).

### **5.3.3 Métodos de diferenciación dopaminérgica.**

Existe diferentes métodos que permiten la obtención de NDAs a partir de PSC, pero como se ha mencionado antes, la mayoría de estos siguen el mismo principio, usando tres pasos fundamentales: la neuralización, la especificación y maduración; sin embargo, existen otros métodos de obtención de NDAs como la reprogramación directa, la formación de agregados celulares conocidos como cuerpos embrioides (EB, por sus siglas del inglés *embryonic bodies*) y el cocultivo con células estromales que no siguen propiamente estos tres pasos, pero que ofrecen otros beneficios metodológicos.

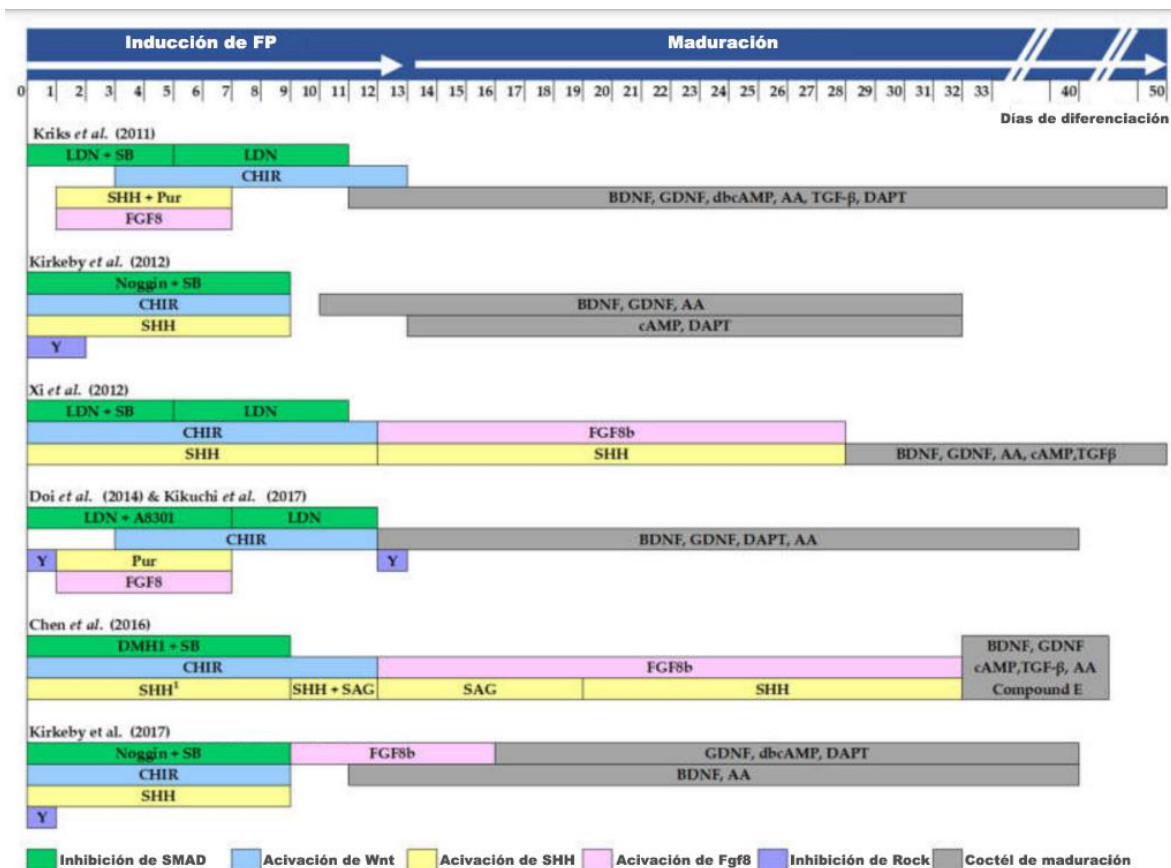
La conversión o reprogramación directa es un proceso en el cual se sobreexpresan ciertos genes que están relacionados con el linaje neural en células somáticas, para así transformar estas células a neuronas o precursores neurales. Si bien aquí también se utiliza el término “reprogramación”, es importante señalar que estas células no pasan por el estadio pluripotencial como las iPSC. La expresión de factores de transcripción como *Ascl1*, *Mash1* y *Myt1l* en fibroblastos de ratón y humano, demostraron ser suficientes para que estas células se reprogramaran a progenitores neurales, aunque en el caso de las células humanas se requería de la adición de otro factor llamado *NeuroD1* (Vierbuchen et al., 2010; Pang et al., 2011). También se ha demostrado la conversión de células somáticas a células con fenotipo dopaminérgico usando *Ascl1* en combinación con factores de determinación o inducción dopaminérgica como *Lmx1a*, *FoxA2*, *Nurr1* o *Pitx3* (Caiazzo et al., 2011; Kim et al., 2011).

Los métodos basados en la formación de EB también han sido muy utilizados para la obtención de este tipo neural. El más conocido es el método de los 5 pasos descrito por Lee y colaboradores en el año 2000 (Lee et al., 2000), el cual consiste en: 1) la expansión de ESC; 2) formación de EB; 3) selección de células positivas a nestina en medio definido; 4) Expansión de las células positivas a nestina, además de estimulación temprana con los

morfógenos SHH, Fgf8 y ácido ascórbico y 5) maduración de las NDAs removiendo los morfógenos. Este método permite la obtención de células TH positivas con propiedades sinápticas y capaces de liberar DA en el medio. Cabe señalar que la eficiencia de diferenciación de este método depende del tamaño del EB formado (Zhang et al., 2001) y de los morfógenos utilizados (se muestra una imagen del protocolo en la Figura 2).

El cocultivo con células estromales como la línea MS5 o PA6 puede promover la diferenciación de mESC a NDAs junto con la adición de moléculas como Fgf20 y Fgf2, aunque los métodos recientes utilizan Noggin y Wnt5a como moléculas de inducción temprana en cultivo (Takagi et al., 2005; Sanchez-Pernaute et al., 2008). Ambos métodos han mostrado una producción eficiente de células TH positivas que son capaces de liberar dopamina y que mostraron propiedades electrofisiológicas características de las NDAs *in vitro*. Si bien este método puede generar NDAs, estas han mostrado una baja supervivencia cuando son trasplantadas en ratas lesionadas, además de generar células con fenotipos no deseados, como astrocitos y neuronas serotoninérgicas (Zeng et al., 2004; Roy et al., 2006).

Finalmente, existen protocolos que utilizan factores de crecimiento y moléculas pequeñas que inducen la diferenciación de ESC a NDAs, utilizando las tres etapas mencionadas anteriormente. Estos protocolos mimetizan el desarrollo embrionario desde la etapa de blastocisto hasta la diferenciación del MV de la siguiente manera: 1) Se promueve la inducción de ESC hacia células del ectodermo mediante la adición de dos moléculas (LDN y SB) pequeñas que inhiben la señalización por BMP y receptores del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas del inglés *transforming growth factor  $\beta$* ), bloqueando la señalización río abajo de las proteínas SMAD y, por consiguiente, el desarrollo de linajes mesodermales y endodermales (Chambers et al., 2009); 2) la especificación hacia el destino mesencefálico se da mediante la estimulación temprana con SHH y Fgf8, además de una molécula que estimula la señalización de la vía de Wnt (CHIR), mediante la inhibición de GSK3 $\beta$  el cual es un inhibidor de esta vía; 3) finalmente, se utilizan moléculas y medios que ayudan a las células a madurar, incluyendo moléculas como las neurotrofinas o factores neurotróficos, que promueven la reducción de estrés oxidativo y moléculas que funcionan como segundos mensajeros. Estas últimas moléculas varían bastante en cada protocolo y depende del grupo de investigación que se consulte en la bibliografía (Kriks et al., 2011; Doi et al., 2014; Grealish et al., 2014; Kirkeby et al., 2017). Sin embargo, todos estos protocolos parten de la obtención primaria de progenitores FoxA2 positivos o Lmx1a positivos que darán lugar a la obtención de NDAs específicas de la región del MV (Figura V).



**Figura V. Protocolos de diferenciación de ESC usando el método de inhibición dual de SMAD.** Desde el 2011 con los trabajos de Kriks, estos métodos han sufrido ligeras modificaciones en el coctel de maduración. También se han modificado los tiempos de inducción por Fgf8 y el uso del inhibidor de ROCK. La constante siempre es la inhibición dual de SMAD para inducir la formación de progenitores de placa de piso (FP). Esta imagen fue modificada de Wang et al., 2020.

No todos los protocolos mencionados en esta sección han demostrado la integración de las NDAs en el estriado de animales lesionados y algunos han mostrado una baja eficiencia de la supervivencia de las células trasplantadas a largo plazo, además de una inervación pobre en el sitio de trasplante y poca integración al tejido a largo plazo. Adicionalmente, se ha demostrado que la función de las NDAs trasplantadas se ve reducida en ratas con edad avanzada debido al pobre soporte trófico del cerebro hospedero (Collier et al., 1999). Por esta razón, se ha planteado el uso de moléculas que ayuden a la maduración, integración y supervivencia de NDAs una vez que sean trasplantadas (Di Santo and Widmer, 2018; Collier et al., 2019). Los mejores candidatos para llevar a cabo la función de estimulación de supervivencia y maduración son las NF y los NTF, los cuales han mostrado en ensayos *in vitro* que ayudan a la maduración y supervivencia de diferentes tipos neuronales, siendo incluso utilizados como terapia para el tratamiento de la EP y en los protocolos de diferenciación DAérgica durante la etapa de maduración (Di Santo and Widmer, 2018; Gouel et al., 2019a). De estos, el más interesante es el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, por sus siglas del inglés *glial-cell derived neurotrophic factor*), el cual ha

mostrado que promueve la supervivencia y maduración de NDAs *in vitro* e *in vivo*, además de tener otras funciones no asociadas a su función de factor neurotrófico, pero que ayudan a la función dopaminérgica (Cortés et al., 2017).

#### **5.4 Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)**

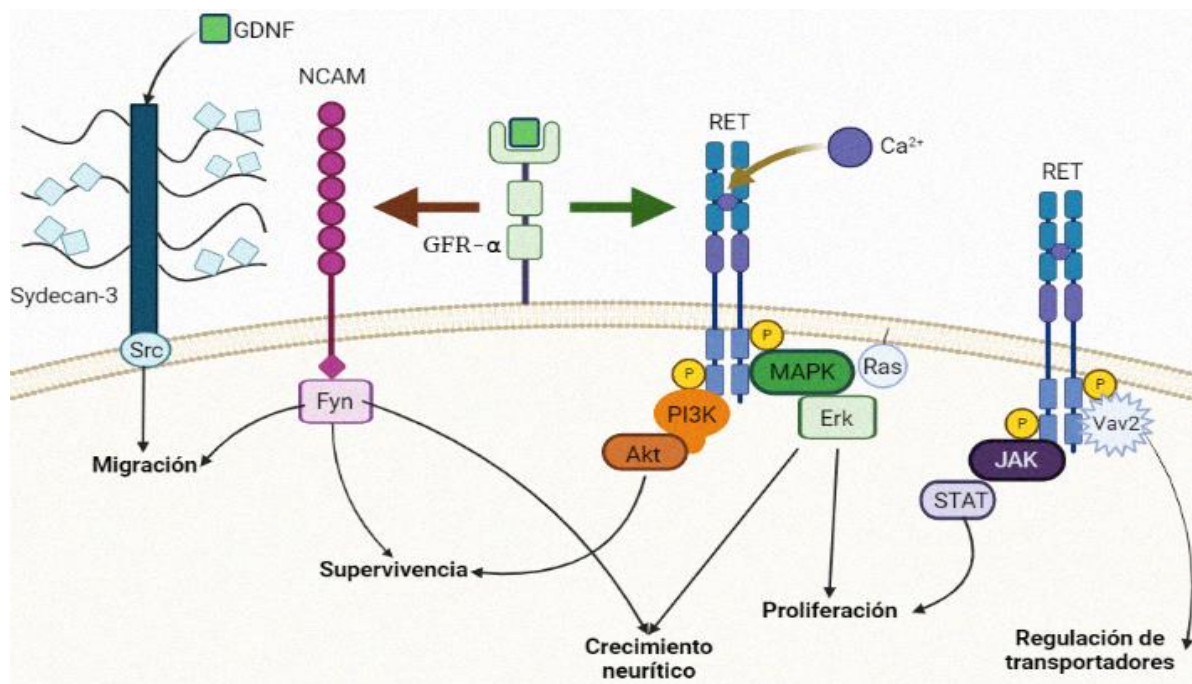
Este factor purificado a partir de las células de glioma, permite la supervivencia de NDAs en cultivo, además de que mostró que promovía la maduración, crecimiento neurítico y la captación de DA en cultivo (Lin et al., 1993). Si bien durante los primeros ensayos se observó que este efecto era específico de NDAs ya que el número total de neuronas en los cultivos no se veía afectado, se ha demostrado que tiene efectos relacionados a la supervivencia y maduración de motoneuronas y neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central (Lamas et al., 2014; Marquardt et al., 2015; Cortés et al., 2016). Se ha demostrado que ratones KO para el GDNF mueren a los pocos días de haber nacido debido a complicaciones en la formación del sistema nervioso entérico (los precursores entéricos no migraron) y falla renal. Mutantes para el receptor GFR- $\alpha$  (*GDNF family receptor*) en ratón también mostraron fallas en estos órganos, indicando que el GDNF tiene actividad biológica más allá del sistema nervioso central (Pichel et al., 1996; Taraviras et al., 1999; Gianino, 2003). Si bien el efecto del GDNF en NDAs *in vitro* y en tejido mesencefálico en cultivo ha sido ampliamente estudiado, su efecto en *in vivo* ha resultado más complicado de esclarecer, pues al parecer no tiene un efecto de supervivencia o maduración en NDAs post-natales (Kopra et al., 2015).

En cultivo, el GDNF favorece la maduración sináptica de las NDAs derivadas del MV. De forma interesante, también se observó que este factor podía ayudar a la diferenciación de precursores dopaminérgicos hacia NDAs cuando eran co-estimulados con GDNF y la interleucina 1, mostrando un incremento en la expresión del marcador TH, además de promover la morfología neural e incrementar el número de extensiones neuríticas (Ling et al., 1998; Bourque and Trudeau, 2000). Debido a estos efectos tróficos, el GDNF ha sido utilizado en combinación con otros NTF o NF en cultivo para incrementar el número de NDAs obtenidas de diferentes protocolos de diferenciación de ESC (Kriks et al., 2011; Grealish et al., 2014; Kirkeby et al., 2017), siendo utilizado, generalmente, con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), TGF $\beta$  y dibutiril-AMP cíclico.

##### **5.4.1 Señalización de GDNF**

Este factor forma parte de una familia de ligandos la cual se conoce como ligandos de GDNF, la cual incluye a la Neurturina (NTRN), Artemina y Persefina (Sidorova and Saarma, 2016) siendo todos miembros de la superfamilia TGF $\beta$ . Estos factores suelen ser producidos en forma de precursores, para después ser procesados mediante cortes proteolíticos y tener función biológica. GDNF lleva a cabo su función trófica uniéndose a receptores de membrana que forman parte de la familia de GFR- $\alpha$  y al receptor tirosina-cinasa Ret (Irala et al., 2016; Sidorova and Saarma, 2016), teniendo preferencia de unión al receptor GFR-

$\alpha 1$  y GFR- $\alpha 2$  (Figura VI). Una vez que se une al receptor GFR- $\alpha$ , el complejo GDNF- GFR- $\alpha$  se une al receptor Ret que tiene un dominio intracelular de tirosina cinasa, el cual se autofosforila una vez que es estabilizado por  $Ca^{2+}$ , activando así múltiples vías de señalización como la vía RAS/ERK , también conocida como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), que promueve la supervivencia celular y PI3K/AKT que induce la supervivencia, diferenciación, crecimiento y formación de neuritas en las NDAs (Airaksinen and Saarma, 2002; Ernsberger, 2008); además, se ha demostrado que el GDNF también regula la expresión de receptores de DA como el DAT mediante la interacción GDNF- GFR- $\alpha$ -Ret, promoviendo la expresión de factor de intercambio del nucleótido de guanina Vav2, mostrando que los efectos del GDNF van más allá de una función neurotrófica (Zhu et al., 2015). Si bien la interacción de los receptores GDNF- GFR- $\alpha$  es necesaria y pareciera ser una vía canónica de GDNF, otras vías e interacciones han sido relacionadas con este NTF en otros tipos neuronales. Por ejemplo, el complejo GDNF- GFR- $\alpha$  se puede unir a la molécula de adhesión de células neurales (NCAM, por sus siglas del inglés *neural cell adhesion molecule*), estimulando el crecimiento axonal, la supervivencia de neuronas corticales, el crecimiento axonal y la migración de otras poblaciones celulares mediante la activación de la vía de Fyn, un miembro de la familia de receptores tirosina cinasa (Paratcha et al., 2003; Cao et al., 2008). Otro tipo de moléculas a las que se puede unir el GDNF es al proteoglicano Syndecan-3, promoviendo la migración tangencial de las neuronas GABAérgicas mediante la activación de la proteína tirosina cinasa Scr (Bespalov et al., 2011) y a la N-cadherina, promoviendo maduración y supervivencia independiente de la vía de Ret (Zuo et al., 2013).



**Figura VI. Señalización de GDNF.** Este NTF tiene dos vías por las cuales llevar a cabo su actividad biológica: 1) uniéndose al receptor GFR- $\alpha$ : el GDNF se une al receptor formando el complejo GDNF-

GFR- $\alpha$ , el cual se une después al receptor Ret. Este receptor se dimeriza al recibir la señal y se estabiliza por medio de  $Ca^{2+}$  para que sus dominios de Tirosina cinasa se autofosforilen llevando a cabo varias señales río abajo. La más conocida es la activación de la vía PI3K/AKT, pero también activa la vía de las MAPK cinasas, la vía JAK/STAT y la vía de Vav2 que regula al DAT; además, GDNF-GFR- $\alpha$  también activan al receptor NCAM, el cual promueve la supervivencia mediante la activación de la cinasa Fyn, promoviendo supervivencia y crecimiento neurítico; 2) de forma directa con la interacción al receptor Sydecin-3: el GDNF activa a este receptor en neuronas GABAérgicas, promoviendo la migración tangencial de éstas.

#### 5.4.2 GDNF en el tratamiento de la EP

Al demostrarse que este NTF podía promover la supervivencia de NDAs embrionarias *in vitro* mediante la actividad de los receptores GFR- $\alpha$  y Ret, se propuso utilizar a esta molécula como una herramienta terapéutica en la EP, ya que las NDAs que se encuentran en la SNpc expresan también los receptores ya mencionados; además se observó que en el cerebro de pacientes con la EP había un incremento moderado en la expresión de GDNF en el putamen, así como un decremento del BDNF en la SNpc (Mogi et al., 1999, 2001), indicando que los NTF tenían actividad durante la enfermedad.

Existen muchos estudios en donde se muestran los beneficios terapéuticos del GDNF en modelos animales de la EP, usando la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el 1-methyl-4-fenil-2,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), los cuales provocan la degeneración selectiva de las NDAs. Sin embargo, el GDNF presenta algunas complicaciones para su administración ya que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que su aplicación debe ser localizada usando diferentes métodos, tales como la inyección intraventricular o la administración directa en el estriado (Evans and Barker, 2008). Con ambos métodos, en los modelos animales de esta enfermedad, se ha observado la recuperación en ensayos conductuales, además de que se observó una mayor supervivencia de NDAs, por lo que el GDNF ha llegado incluso a ser propuesto para ensayos clínicos en pacientes con EP. Las primeras pruebas clínicas utilizaron la administración intraventricular, pero no mostraron beneficios a los pacientes, probablemente debido a que el GDNF no alcanzaba a llegar al estriado (Kordower, 2003). Esto incentivó el uso de nuevos protocolos en los cuales la administración de este NTF se realizó mediante el uso de un catéter intraparenquimal que inyectaba GDNF en la región del putamen de forma unilateral o bilateral (Gill et al., 2003). Este trabajo mostró una mejoría en los síntomas de los pacientes, así como un incremento en los niveles de recaptura de DA en el sitio de infusión, así como en la SNpc, demostrando que el GDNF puede promover la restauración del sistema dopaminérgico; sin embargo, el GDNF debió mantenerse en infusión por largos periodos de tiempo, aumentando las tasas de infusión a los 18 meses del primer tratamiento. Es de notar que este trabajo se realizó solo en 5 pacientes, por lo que el efecto placebo no pudo ser estimado; además, al ser removido el GDNF los efectos se perdían a los dos meses.

Debido a varias inconsistencias en los resultados de algunos trabajos posteriores (Slevin et al., 2005; Lang et al., 2006) surgidos por la variabilidad en la edad de los pacientes y en los

métodos de administración del GDNF, en los últimos años se realizaron un par de ensayos clínicos usando pruebas con mayor rigurosidad, usando un método de ensayo doble ciego. Ambos trabajos mostraron que el GDNF no mejoraba de forma significativa los síntomas de la enfermedad en los pacientes con la EP, a pesar del incremento de DA en el estriado medido por tomografía de emisión de positrones (PET) midiendo la recaptura del fármaco  $^{18}\text{F}$ -DOPA (Whone et al., 2019a, 2019b). Las razones por las cuales este NTF no funcionó no son muy claras, pero los autores especulan que se debe a que el GDNF simplemente no puede promover la recuperación del sistema dopaminérgico debido a la presencia de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína, sugiriendo que esta patología afecta las vías por las cuales lleva a cabo su efecto el GDNF. Otra explicación es que la dosis de GDNF pudo haber sido muy baja, siendo de 120  $\mu\text{g}$  de GDNF en 4 semanas (la máxima dosis administrada en ensayos clínicos continuos es de 840  $\mu\text{g}$  de GDNF), sin embargo, se ha demostrado que la administración de dosis altas de GDNF puede promover efectos compensatorios no deseados e inducir la aparición de discinesias o disminución de la sensibilidad al fármaco L-DOPA (Tenenbaum and Humbert-Claude, 2017).

Es por esta razón que los ensayos pre-clínicos usando GDNF han sido reevaluados para mejorar tanto los métodos de administración como las dosis utilizadas, surgiendo una nueva corriente de métodos que utilizan métodos de administración lentivirales (Su et al., 2009; Kells et al., 2012a; Gantner et al., 2020) o el cotrasplante de NDAs con células que fueron modificadas genéticamente para que expresen este NTF (Deng et al., 2013; Perez-Bouza et al., 2017b; Widmer, 2018), mostrando resultados prometedores en modelos animales de la enfermedad.



## VI. ANTECEDENTES

El GDNF ha demostrado ser un factor importante en el mantenimiento, diferenciación y supervivencia de las NDAs obtenidas del MV de embriones, así como de cultivos de células con este fenotipo neural que son diferenciadas a partir de ESC (Lin et al., 1993; Yurek, 1998; Kriks et al., 2011), siendo utilizada como una molécula fundamental en los protocolos de diferenciación.

La administración de la neurotoxina 6-OHDA induce la muerte selectiva de NDAs *in vivo* e *in vitro*. La adición de GDNF en cultivos tratados con esta neurotoxina mostró un aumento en la supervivencia de las NDAs aun en presencia de un fuerte reto citotóxico (Choi-Lundberg et al., 1997; Kirik et al., 1998), mostrando la capacidad neurotrófica de esta molécula y su potencial uso en el tratamiento de la EP, en donde hay muerte selectivas de las NDAs de la SNpc.

El uso de GDNF para tratar los síntomas de la EP ha mostrado una gran eficiencia en modelos animales de la enfermedad (Choi-Lundberg et al., 1997; Kirik et al., 2000; Kordower et al., 2000; Akerud et al., 2001), sin embargo, no se han observado resultados positivos cuando el GDNF es utilizado en ensayos clínicos (Whone et al., 2019a, 2019b), sugiriendo que el GDNF por sí solo no puede recuperar el sistema dopaminérgico e inducir una mejora en los síntomas motores de la enfermedad. Se ha planteado el uso de NDAs derivadas de ESC como una alternativa al tratamiento de la EP, ya que este método permite reemplazar las neuronas perdidas durante la enfermedad. Ensayos en modelos animales han demostrado que el trasplante de NDAs derivadas de ESC promueven la recuperación conductual de animales lesionados (Lee et al., 2000; Chung et al., 2002; Kriks et al., 2011; Grealish et al., 2014). Sin embargo, muchos de estos ensayos mostraron un bajo porcentaje de supervivencia de las NDAs trasplantadas, además de poca inervación en el estriado y no se analizó si estas neuronas eran capaces de liberar DA en el estriado, por lo que estas interrogantes siguen presentes.

Para promover la supervivencia, maduración e integración de las NDAs trasplantadas, algunos investigadores han utilizado NTF y NF como soporte trófico a estas neuronas, siendo estos administrados mediante vectores lentivirales (Olanow et al., 2015; Gantner et al., 2020) o el cotrasplante de NDAs con células que expresen GDNF o NRT de forma constitutiva (Deng et al., 2013; Perez-Bouza et al., 2017b); sin embargo, existe una amplia discusión sobre estos métodos ya que requieren el uso de células o virus, los cuales representarían un riesgo a futuro para el paciente (Tenenbaum and Humbert-Claude, 2017). Debido a la necesidad de un sistema que permita la expresión de GDNF como soporte trófico de NDAs trasplantadas, sin la necesidad del uso de cotrasplantes o lentivirus, en este trabajo se utilizó una línea de mESC que expresa este NTF de forma constitutiva para analizar el efecto en la diferenciación dopaminérgica y la posible neuroprotección después

de retos tóxicos *in vitro* o después del trasplante en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA.

## **VII. JUSTIFICACIÓN**

La supervivencia de las NDAs es un aspecto clave en la EP, debido a que la muerte de estas neuronas provoca un desbalance en el sistema dopaminérgico, provocando la aparición de los síntomas relacionados a esta enfermedad. Se ha propuesto el uso de NDAs diferenciadas a partir de ESC como una alternativa al tratamiento de la enfermedad, sin embargo, las NDAs trasplantadas en diferentes modelos animales han mostrado poca integración, supervivencia e inervación en el cerebro hospedero debido al poco soporte trófico. Es por esto que se ha planteado el uso de métodos que ayuden a estas neuronas a sobrevivir y madurar una vez que sean trasplantadas en cerebros lesionados, siendo el uso de los NTF y NF una de las estrategias más prometedoras.

## **VIII. HIPÓTESIS**

La expresión sostenida de GDNF en distintas etapas durante la diferenciación de ESC promoverá la inducción a NDAs del mesencéfalo ventral; además, aumentará la supervivencia y maduración de este tipo celular ante retos tóxicos y posterior al trasplante de NDAs en un modelo animal de la EP.

## **IX. OBJETIVO**

Estudiar el efecto de la producción autócrina de GDNF, posterior al trasplante de neuronas dopaminérgicas que secretan este factor neurotrófico de forma constitutiva en el cerebro de ratas hemiparkinsonianas, para establecer si la supervivencia es mayor a la de las células control, así como conocer su eficiencia en la recuperación de los animales.

## X. MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales.** Se utilizaron ratas adultas hembras de la cepa Wistar de entre 220-250 gramos de peso. Los animales fueron alojados y manejados de acuerdo con la norma local de manejo de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 y a la guía internacional para el uso de animales de laboratorio (Animal Welfare Assurance A5281-01). Se utilizó el protocolo CICUAL avalado por el comité de ética del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a temperatura ambiente (22 °C +/- 2 °C). Comida y agua fueron brindados *ad libitum*.

**Líneas celulares CTRL-ESC y GDNF-ESC.** La línea celular R1 mESC fue transducida con lentivirus conteniendo el vector pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro (Clontech 631988) vacío, con el cual se obtuvo la línea control de mESC (CTRL-ESC). La misma línea R1 mESC se transdujo con otros lentivirus conteniendo el vector pLVX-EF1 $\alpha$ -hGDNF-IRES-Puro, con el cual se obtuvo la línea de mESC que expresa GDNF de forma constitutiva (GDNF-ESC). Las líneas se seleccionaron en cultivo usando un tratamiento de puomicina (Sigma P8833) por 24 horas a una concentración de 2  $\mu$ g/ml. Las colonias resistentes se expandieron para los siguientes estudios. Ambas líneas celulares fueron donadas por el Dr. Daniel Cortés (Cortés et al., 2016).

**Genotipificación.** Posterior a la expansión de las mESC control y GDNF, las células se levantaron usando Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco), se lisaron y se extrajo el DNA usando un kit de extracción de DNA genómico (Thermo Fisher, K0512). Se realizó PCR punto final para la detección de la secuencia de GDNF humano y GAPDH como control de reacción. Las secuencias de los primers utilizados (todos con dirección 5'-3') fueron las siguientes: hGDNF: Forward (Fwd), AACAAATGGCAGTGCTTCCT y Reverse (Rev), AGCCGCTGCAGTACCTAAAA; para GAPDH: Fwd, ATCACCATCTCCAGGAGCG y Rev, CCTGCTTCACCACCTTCTTG. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos a 59 °C como temperatura de alineamiento.

**Diferenciación de ESC a NDa.** El protocolo de diferenciación dopaminérgica fue llevado a cabo siguiendo un método previamente publicado (Lee et al., 2000), el cual consiste en cinco etapas (véase Figura 2a para resumen gráfico). Las células CTRL-ESC y GDNF-ESC fueron cultivadas en placas de 100 mm, previamente tratadas con gelatina al 0.1% (Sigma). Para mantener a las células en un estadio indiferenciado (etapa uno), se utilizó medio KO DMEM (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Biowest), 1 % de aminoácidos no esenciales (Thermo Fisher), 2 mM de glutamax, 55  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol (Thermo Fisher), 50 UI/ml de penicilina-estreptomina (Thermo Fisher) y 1000 UI de factor inhibidor de la leucemia (Millipore). Para la segunda etapa, las células fueron disociadas con Tripsina-EDTA al 0.05% y colocadas en placas de 100 mm no

adherentes para inducir la formación de EBs en suspensión por cuatro días. En la etapa tres, los EBs fueron recolectados y sembrados en cajas de cultivo adherentes durante 6 días en medio Insulina-transferrina-selenito (ITS) libre de suero, suplementado con 5 µg/ml de fibronectina (Fn; Invitrogen). La expansión de las células nestina positivas (etapa cuatro) se inició levantando las células con tripsina y eliminando los EBs. Posteriormente, las células en suspensión se sembraron en cubreobjetos de vidrio (previamente tratados con 15 µg/ml de poli-L-ornitina (Sigma) y 1 µg/ml de Fibronectina) en medio N2 (Gibco) conteniendo 10 ng/ml del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, por sus siglas del inglés *basic fibroblast growth factor*), 100 ng/ml de FGF8 y 100 ng/ml de *Sonic Hedgehog* (R&D Systems) durante 4-6 días. La diferenciación terminal en la etapa cinco fue inducida removiendo los factores de crecimiento y adicionando medio N2 con 200 µM de ácido ascórbico por 6-8 días. Este protocolo induce la diferenciación determinada de NDAs postmitóticas de ratón (entre 20-30% de las neuronas diferenciadas); sin embargo, también se han observado bajas proporciones de neuronas serotoninérgicas (5-10%) (Lee et al., 2000).

**Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de GDNF liberado al medio.** El medio condicionado, obtenido durante 24 horas, de las líneas CTRL-ESC y GDNF-ESC en cada una de las 5 etapas de diferenciación (ver sección de diferenciación a NDA) fue sometido a una detección de GDNF por medio de un ELISA, usando el kit de detección GDNF Emax Immunoassay System de Promega (sensibilidad: 4 pg/mL; rango de detección: 2.74-2000 pg/ml). Especificidad en humano.

**Ensayo de toxicidad.** Las NDAs diferenciadas se incubaron por 2 horas a 37 °C con 200 µM de 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Sigma). El medio fue removido y cambiado por medio fresco. Veinticuatro horas después, las células se fijaron para su evaluación por inmunocitoquímica. La neurotoxina 6-OHDA es capturada por los transportadores de dopamina y, por lo tanto, no afecta a otros tipos neuronales presentes en el cultivo (Ungerstedt, 1968).

**Inmunocitoquímica y cuantificación.** Las células se fijaron usando 4% de paraformaldehído (PFA) por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, se lavaron las células con una solución PBS y se permeabilizaron las membranas usando una solución de PBS con 0.3% de Triton X-100 (Sigma) y 10% de suero normal de cabra. Los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche en 10% de suero normal de cabra en PBS a 4 °C. Después, se realizaron lavados con PBS + 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) y las muestras se incubaron usando anticuerpos secundarios conjugados con compuestos fluorescentes, solos o en combinación. Finalmente, para la detección nuclear, se lavaron las muestras con PBS + 0.1% de BSA y se incubaron con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Vector Labs). Para la cuantificación de la eficiencia de diferenciación dopaminérgica, el número de somas TH positivos fueron divididos por el número total de neuronas marcadas por el anticuerpo TUJ1 y multiplicado por 100. Para corroborar esto, también se realizó un análisis de correlación de Pearson de la co-localización de las marcas de TUJ1 y TH con el programa de análisis de

imágenes FIJI, usando el paquete JACoP para obtener el porcentaje de co-localización (Bolte and Cordelières, 2006; Dunn et al., 2011). El área se determinó por la intensidad de píxeles en cada imagen. La señal de TUJ1 fue establecida como el área total y la señal de TH fue establecida como la variable. De esta forma, el porcentaje de la señal de TH fue normalizado usando el total de la señal de TUJ1. Para las neuronas SEROTONINA positivas, el porcentaje de neuronas marcado con los anticuerpos fue normalizado usando el número total de núcleos. Todas las señales fluorescentes fueron detectadas usando el microscopio confocal Nikon A1R HD25 para detectar Alexa 488, Alexa 568, Alexa 647 y Hoechst 33258 excitando con diferentes láseres. Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 3.** Lista de anticuerpos usados en inmunocitoquímica.

| Anticuerpo | Hospedero | Dilución | Marca          |
|------------|-----------|----------|----------------|
| SOX2       | Conejo    | 1:500    | R&D Systems    |
| OCT 3/4    | Ratón     | 1:1000   | BD Biosciences |
| TUJ1       | Ratón     | 1:1000   | Covance        |
| TH         | Conejo    | 1:1000   | Pel-Freez      |
| FOXA2      | Conejo    | 1:500    | Millipore      |
| LMX1B      | Conejo    | 1:200    | Abcam          |
| SEROTONIN  | Conejo    | 1:500    | Sigma          |

**Extracción de RNA, síntesis de cDNA y RT-PCR cuantitativo.** El ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas del inglés *Ribonucleic acid*) fue aislado usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) y siguiendo las indicaciones del fabricante. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado usando la transcriptasa reversa SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher), con 2 µg de RNA total y usado para la amplificación por medio de RT-PCR (Taq DNA Polimerasa, Thermo Fisher). Para el análisis cuantitativo (qPCR), se utilizó el iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) en el equipo de detección de qPCR Real-Time PCR Detection System (CFX96; Bio-Rad). El gen *Gapdh* se utilizó para normalizar los datos y la expresión relativa se calculó usando el método de  $\Delta\Delta C_T$ . Las condiciones para la qPCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 15 segundos. Las secuencias de los primers utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión fueron las siguientes: *Oct4*: Fwd, TTG GGC TAG AGA AGG ATG TGG TT; Rev, GGA AAA GGG ACT GAG TAG AGT GTG G. For *Sox2*: Fwd, GCA CAT GAA CGG CTG GAG CAA CG; Rev, TGC TGC GAG TAG GAC ATG CTG TAG G. For *Th*: Fwd, CCA CTG GAG GCT GTG GTA TT;

Rev, CCG GGT CTC TAA GTG GTG AA. For *Foxa2*: Fwd, CAG AAA AAG GCC TGA GGT G; Rev, CAG CAT ACT TTA ACT CGC TG. For *Gapdh*: Fwd, CAT CAC TGC CAC CCA GAA GAC TG; Rev, ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AG.

**Lesión con 6-OHDA, prueba de rotación inducida por apomorfina y prueba de conducta no farmacológica.** La lesión con 6-OHDA fue realizada siguiendo protocolos previamente reportados (Ungerstedt, 1968; Díaz-Martínez et al., 2013). Este modelo animal muestra recuperación conductual y bioquímica después del trasplante de NDAs (Chung et al., 2002; Rodríguez-Gómez et al., 2007).

*Lesión unilateral con 6-OHDA.* Las ratas fueron anestesiadas con sevoflorano (Sevorane Abbott) a dosis de inducción (3%) y 0.5% de mantenimiento en una mezcla de oxígeno al 95% y bióxido de carbono al 5%. Para minimizar el estrés, las ratas fueron mínimamente manipuladas y se mantuvieron con anestesia inhalada (0.5%-1.5% de sevoflorano). Después, se realizó una desinfección del área de incisión con yodo, alcohol al 70% y yodo nuevamente (este proceso se repitió dos veces más). Las ratas fueron colocadas en el equipo de cirugía estereotáxica Dual Digital Lab Standar (Stoelting), se realizó una incisión en la línea media del cráneo y se realizaron microinyecciones de 6-OHDA en el fascículo medial del cerebro anterior siguiendo las siguientes coordenadas estereotáxicas con relación a bregma: anteroposterior (AP), -1.0 mm; lateral (L), 1.5 mm; dorsoventral (DV), -0.8 mm. Las microinyecciones se realizaron con el equipo automatizado de microinyección Quintessential Stereotaxic Injector (Stoelting) de la siguiente forma: 12 µg de 6-OHDA disueltos en 4 µl de solución salina fisiológica con 0.05% de ácido ascórbico usando una velocidad de 1 µl/minuto durante 4 minutos. Finalmente, se realizó el cierre quirúrgico colocando grapas quirúrgicas de 9 mm (EZ Clips TM, Stoelting) y limpiando la zona de incisión con yodo/alcohol. A todos los animales se les administró enrofloxacin (5 mg/kg; Bayer) durante 3 días para evitar infecciones y complicaciones post quirúrgicas. Todos los animales se mantuvieron en observación y fueron monitoreados hasta su recuperación.

*Rotaciones inducidas con apomorfina (reto farmacológico).* Cuatro semanas posteriores a la lesión unilateral con 6-OHDA, se les administró a las ratas 1 mg/kg de apomorfina (Sigma) de forma subcutánea, para después ser colocadas en un equipo de actividad rotacional (Roto-rat MED-RRS; Med Associates INC), el cual consta de un tazón de metal, un arnés para la rata y un dispositivo electrónico que contabiliza el número total de giros por hora. Los animales con 350 o más giros contralaterales al sitio de lesión en una hora se consideraron como animales lesionados.

*Prueba de ajuste de paso (reto no farmacológico).* Esta prueba fue realizada siguiendo un protocolo previamente reportado (Chung et al., 2002; Díaz-Martínez et al., 2013). La rata se sostuvo con una mano por el abdomen levantando sus extremidades posteriores y después se desplazó de forma frontal 90 cm sobre una superficie plana durante 5 segundos. El animal solo puede apoyar una de las extremidades anteriores, de esta forma es posible manipular con cual extremidad anterior se realizará el ensayo. Cada miembro anterior fue

independientemente evaluado contando el número de pasos en la superficie plana. Se realizaron cinco repeticiones con cada extremidad por rata. Los valores de la extremidad lesionada fueron normalizados usando el número de pasos registrados de la extremidad no lesionada (contralateral al sitio de lesión) y representado en las gráficas como el porcentaje de uso de la extremidad lesionada con respecto a la extremidad no lesionada.

**Trasplante de NDAs diferenciadas de CTRL-ESC y GDNF-ESC.** Todos los animales fueron inmunosuprimidos diariamente con ciclosporina A (10 mg/kg, GelPharma), comenzando 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. Las ratas hemiparkinsonianas fueron trasplantadas en el estriado dorsal con las neuronas TH positivas, diferenciadas de las líneas CTRL-ESC y GDNF-ESC. Las NDAs de ambas líneas fueron disociadas a los días 2-3 de la etapa 5 y resuspendidas en una densidad de  $0.5 \times 10^6$  células viables en 3  $\mu$ l de medio N2. Los animales fueron anestesiados y preparados siguiendo el protocolo utilizado en la lesión con 6-OHDA. Una vez que se expuso bregma, se tomaron las siguientes coordenadas para el trasplante en el estriado dorsal lesionado: AP, 0.0 mm; L, 3.0 mm; DV, se realizaron cuatro depósitos separados por 0.5 mm (de -5.5 mm a -4.0 mm). Finalmente, el inyector se retiró del sitio de trasplante después de 5 minutos para evitar que las células trasplantadas fueran removidas por capilaridad y se procedió al cierre de la herida quirúrgica siguiendo el protocolo previamente mencionado en la lesión con 6-OHDA. En los animales Sham, se realizó un depósito de 3  $\mu$ l de medio N2 usando las mismas coordenadas estereotáxicas. Los animales fueron evaluados cada 2 semanas usando las pruebas farmacológicas y no farmacológicas por un periodo de 14 semanas.

**Microdiálisis y cuantificación de dopamina en el estriado.** Los ensayos de microdiálisis para la detección de dopamina fueron realizados 14 semanas después del trasplante. El sitio de detección de dopamina fue la región del estriado dorsal en donde los animales recibieron el trasplante con CTRL-ESC o GDNF-ESC o con la cirugía sham. Previos experimentos con las membranas para diálisis utilizadas en este trabajo (4 mm) mostraron valores de recuperación de entre 15-20% para dopamina y para el ácido 3-4 dihidroxifenilacético (DOPAC, por sus siglas del inglés *3-4 dihydroxyphenylacetic acid*). Las sondas fueron perfundidas con fluido cerebroespinal artificial a una velocidad de 2  $\mu$ l/min durante una hora para estabilizar. Las fracciones fueron colectadas cada 12 min. Posteriormente, se indujo una despolarización química usando un medio isoosmótico (100 mM de cloruro de potasio) a través de la sonda en la fracción número 4 para estimular la liberación de DA. Una segunda estimulación fue dada en la fracción 9 mediante la perfusión de 30  $\mu$ M de anfetamina para estimular la liberación de DA recapturada. Las monoaminas fueron estabilizadas usando 0.1 N de ácido perclórico, 0.02% de EDTA y 1% de etanol, además de ser almacenadas en tubos de vidrio cubiertos para evitar la oxidación. La cuantificación fue hecha mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas del inglés *High performance liquid chromatography*), usando una columna de fase reversa (dC18, 3  $\mu$ m; 2.1 mm x 50 mm; Atlantis, Waters) acoplada a una pre-columna (Nova-Pack Waters), usando

una fase móvil conteniendo una solución de 0.054 mM de EDTA; ácido cítrico, 50 mM y ácido octasulfónico a 0.1 mM disuelto en agua mili-Q y mezclada con metanol en una proporción 97:3, respectivamente (pH = 2.9; tasa de flujo = 0.35 ml/min). La detección de dopamina y de DOPAC fue realizada por un detector electroquímico amperométrico de canal único (Waters modelo 2465) a 450 mV con una temperatura de 30 °C. La concentración de DA y DOPAC fue obtenida calculando la altura de los picos obtenidos en las lecturas y comparadas con los picos generados por soluciones estándar de ambas moléculas (concentraciones conocidas). Las concentraciones obtenidas no fueron corregidas por la tasa de recuperación de las sondas.

**Conteo celular estereológico en cortes.** Los animales fueron perfundidos con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%) y, posteriormente, con PAF al 4% en PBS. Los cerebros fueron recuperados y sometidos a una curva de sacarosa (10% 24 horas; 20% 24 horas; 30% 24 horas) para poder ser criopreservados íntegramente. Se realizaron rebanadas de 30 µM en un criostato, seguido de un marcaje mediante inmunohistoquímica (ver sección “*inmunocitoquímica*”) con anticuerpos anti-TH y anti-βIII-tubulina para realizar el conteo de las NDAs. El conteo fue hecho en cada cinco cortes recuperados y el número de NDAs fue calculado multiplicando el número de neuronas TH positivas por rebanada por el número de rebanadas que contenía células trasplantadas (Coggeshall and Lekan, 1996). Se calculó la media del área marcada de células TUJ1 positivas por mm<sup>3</sup> de al menos 12 rebanadas. Para calcular el porcentaje de células TH en cada rebanada, el número de NDAs fue normalizado por el número de células TUJ1 positivas.

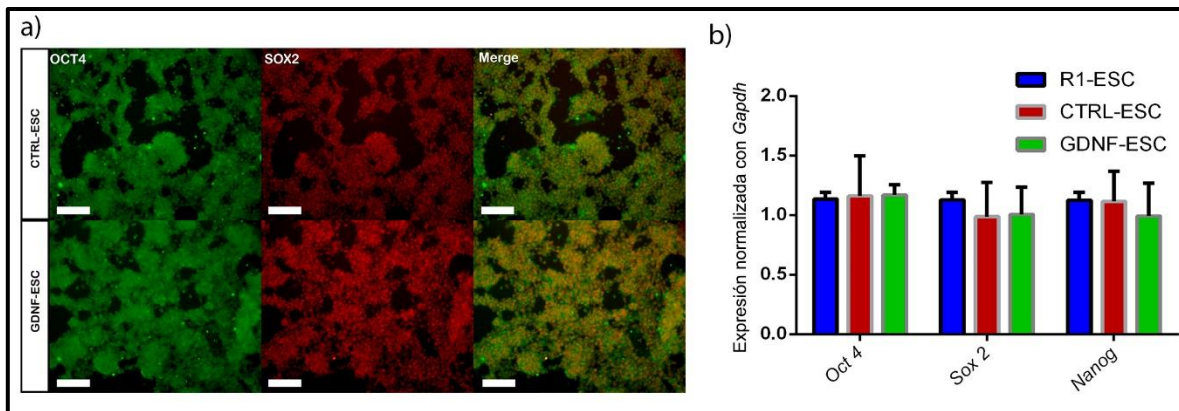
**Análisis estadístico.** Los datos se muestran como el promedio ± SEM. Todos los experimentos fueron realizados al menos por duplicado. Las comparaciones estadísticas se identificaron mediante ANOVA de una vía o por un análisis *t*-student. Las comparaciones múltiples se realizaron por ANOVA de dos vías seguidas por un análisis *post hoc* dado por la prueba de Dunn, con un valor de F=0.00001. El software GraphPad Prism versión 8.0 fue utilizado para realizar todos los análisis de cálculo de probabilidad. En todos los análisis, la significancia estadística fue establecida como valor de p<0.05.



## XI. RESULTADOS

### 10.1 La sobreexpresión de GDNF en la línea GDNF-CTRL no afecta el protocolo de diferenciación.

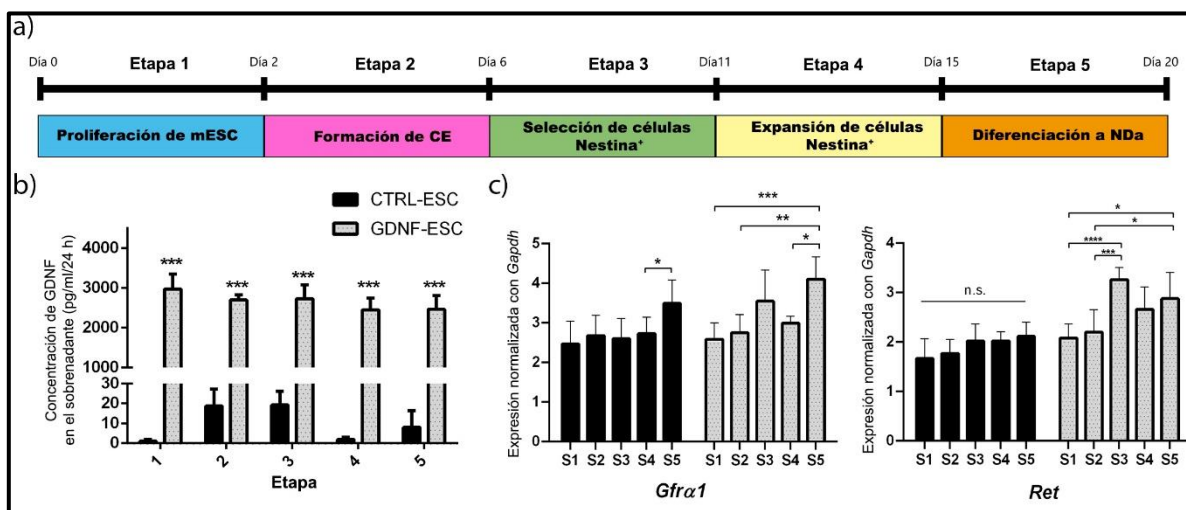
Antes de realizar el proceso de diferenciación, las líneas celulares CTRL-ESC y GDNF-ESC fueron mantenidas en cultivo por 24 horas con puomicina para mantener los cultivos únicamente con las poblaciones que contengan las construcciones pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro y pLVX-EF1 $\alpha$ -GDNF-IRES-Puro respectivamente. Con la finalidad de saber si la transducción del vector control o con el cDNA del GDFN humano afecta el estado de pluripotencia de las mESCs, las células fueron cultivadas por 48 horas y se realizaron inmunotinciones para los marcadores asociados a pluripotencia OCT4 y SOX2. Las células CTRL-ESC y GDNF-ESC presentaron células doble positivas para ambos marcadores (Figura 1a). La proteína NANOG también fue analizada mostrando un patrón nuclear (datos no mostrados); además, por medio de RT-PCR cuantitativa, se midieron los niveles de expresión de RNA mensajero (mRNA, por sus siglas del inglés *messenger RNA*) de los genes *Oct4*, *Sox2* y *Nanog*. Los niveles de expresión de ambas líneas celulares fueron comparados con los niveles de expresión de la línea parental R1 mESC, sin observar cambios en ninguno de los genes (Figura 1b), lo cual sugiere que el estado de pluripotencia no se ve afectado.



**Figura 1.** Los marcadores de pluripotencia no se ven afectados en las líneas CTRL- y GDNF-ESC antes de la diferenciación dopaminérgica. En a) se observan las inmunotinciones para los marcadores asociados a pluripotencia OCT4 y SOX2 en las líneas CTRL-ESC (panel superior) y GDNF-ESC (panel inferior), mostrando una alta proporción de células doble positivas en ambas líneas celulares. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes. En b) RT-qPCR para los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* en ambas líneas. La normalización fue realizada usando la expresión de *Gapdh*. La línea R1 ESC fue usada como una referencia. Datos de cuatro experimentos independientes.

Después de establecer que la línea GDNF-ESC mostraba la expresión normal de los marcadores asociados a pluripotencia, se inició la diferenciación a neuronas dopaminérgicas usando un método previamente descrito (Lee et al., 2000), el cual consiste en un protocolo de 5 etapas (Figura 2a). Para conocer si la expresión y liberación sostenida

de GDNF puede ser detectada durante este protocolo de diferenciación, el medio condicionado de ambas líneas se colectó y se sometió a un ensayo ELISA. La concentración de GDNF fue significativamente mayor en la línea GDNF-ESC comparada con la línea CTRL-ESC en todas las etapas de diferenciación (Figura 2b). Si bien la línea control también mostró liberación al medio de este factor, la diferencia entre esta y la línea transgénica fue cien veces mayor en todas las etapas. El GDNF necesita de dos receptores para llevar a cabo su función como factor neurotrófico, el primero es el  $GFR\alpha 1$  y el segundo es el co-receptor Ret. Por esta razón, se midieron los niveles de expresión de los genes que codifican a estos receptores durante las cinco etapas de diferenciación. En ambas líneas celulares se detectó la expresión del mRNA de ambos receptores durante las cinco etapas de diferenciación. No se encontraron diferencias significativas entre la línea CTRL-ESC y GDNF-ESC; sin embargo, se encontraron algunas diferencias entre las etapas, siendo de particular notoriedad las etapas 4 y 5, en la cual la expresión de estos transcritos fue incrementada significativamente comparada con las otras etapas (Figura 2c). En resumen, estos resultados demuestran que el GDNF está siendo secretado y que sus receptores están siendo expresados, sugiriendo que la diferenciación de mESC a NDAs podría ser estimulada por este factor neurotrófico.

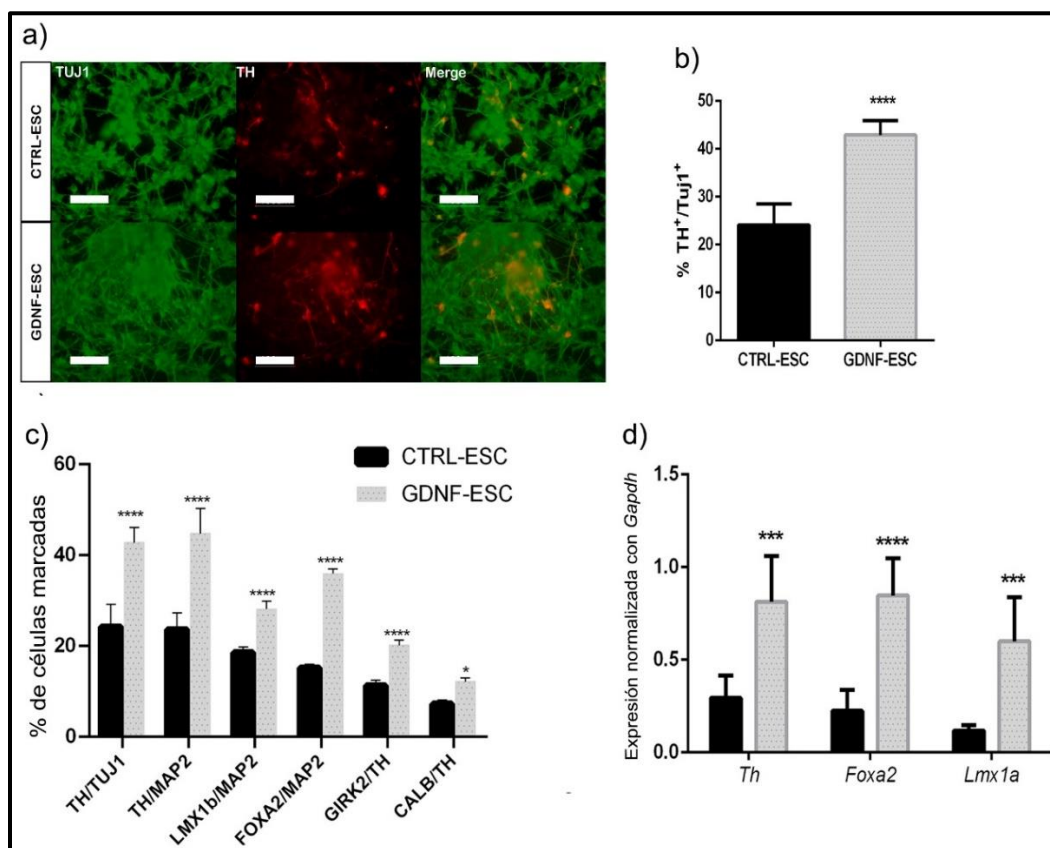


**Figura 2.** El GDNF es liberado al medio y sus receptores son expresados durante las diferentes etapas de la diferenciación. En a) se muestra un esquema del protocolo de diferenciación utilizado en este trabajo. En b), determinación de los niveles de GDNF mediante ELISA en el medio condicionado de 24 horas de las líneas CTRL-ESC y GDNF-ESC durante las cinco etapas de diferenciación. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CTRL-ESC. En c), RT-qPCR mostrando los niveles de mRNA de los receptores de GDNF *Gfra1* y *Ret* durante el proceso de diferenciación de las líneas CTRL-ESC y GDNF-ESC. Los valores fueron normalizados usando los niveles de expresión de *Gapdh*. Se utilizó comparación múltiple por t-student con un valor significativo de  $p < 0.05$ , siendo \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; n = 4 experimentos independientes.

## 10.2 El GDNF genera más NDAs que son más resistentes a 6-OHDA.

Una vez que se confirmó que el GDNF era liberado al medio y que podría tener actividad biológica en las mESC, las NDAs fueron derivadas de las líneas CTRL-ESC y GDNF-ESC. La

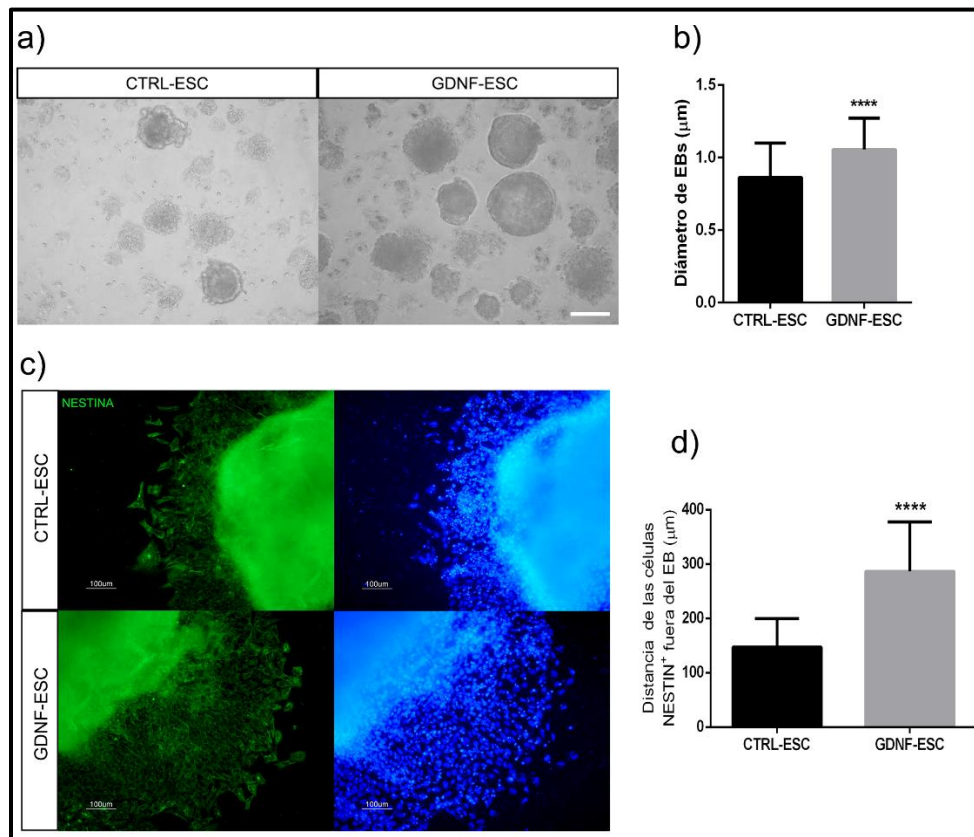
etapa 5 del protocolo de diferenciación representa la determinación de las NDAs, en donde las neuronas que expresan la proteína  $\beta$ -III tubulina, detectada por el anticuerpo TUJ1, empiezan a expresar TH, la enzima limitante en la producción de dopamina. Las neuronas postmitóticas fueron evaluadas para este marcador. Se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de células TH positivas en la línea GDNF-ESC cuando fueron comparadas con la línea control CTRL-ESC (Figuras 3a,b). El incremento en la diferenciación dopaminérgica en la línea GDNF-ESC se confirmó midiendo el porcentaje del área marcada por TH, relativo al marcaje de TUJ1: CTRL-ESC =  $21.6 \pm 2.9\%$ ; GDNF-ESC =  $36.8 \pm 1.2\%$ , mostrando una diferencia estadísticamente significativa después de un análisis *t*-test para una  $n = 6$  ( $p < 0.01$ ). Otros marcadores ventrales mesencefálicos también fueron analizados: FOXA2, LMX1B, GIRK2 y Calbindina, mostrando diferencias estadísticamente significativas en la línea GDNF-ESC cuando se comparó con la línea CTRL-ESC (Figura 3c); además, mediante RT-qPCR, también se analizaron los niveles de expresión de los genes *Th*, *Foxa2* y *Lmx1a* mostrando resultados similares a lo observado en los conteos celulares (Figura 3d).



**Figura 3.** El GDNF incrementa la diferenciación dopaminérgica. En a), se muestran inmunocitoquímicas para los marcadores TH y TUJ1 a los 20 días de diferenciación de las células GDNF-ESC o CTRL-ESC. En b), cuantificación de NDAs, calculado como [número total de somas TH positivos/número total de somas TUJ1<sup>+</sup>] $\times 100$ , para representar el porcentaje en cultivos de 20 días, mostrando un incremento significativo de neuronas TH<sup>+</sup> en las células GDNF-ESC comparadas con el

control. En c), se muestra la cuantificación de los marcadores de mesencéfalo ventral LMX1B, FOXA2., el marcador de NDAs del tipo A9 GIRK2 y Calbindina (CALB), combinados con TUJ1 o la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2). En d), la expresión normalizada de mRNA de genes relevantes para la diferenciación dopaminérgica al día 20. Los datos fueron normalizados con la expresión de *Gapdh*; los resultados de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Barra de escala = 100  $\mu$ m.

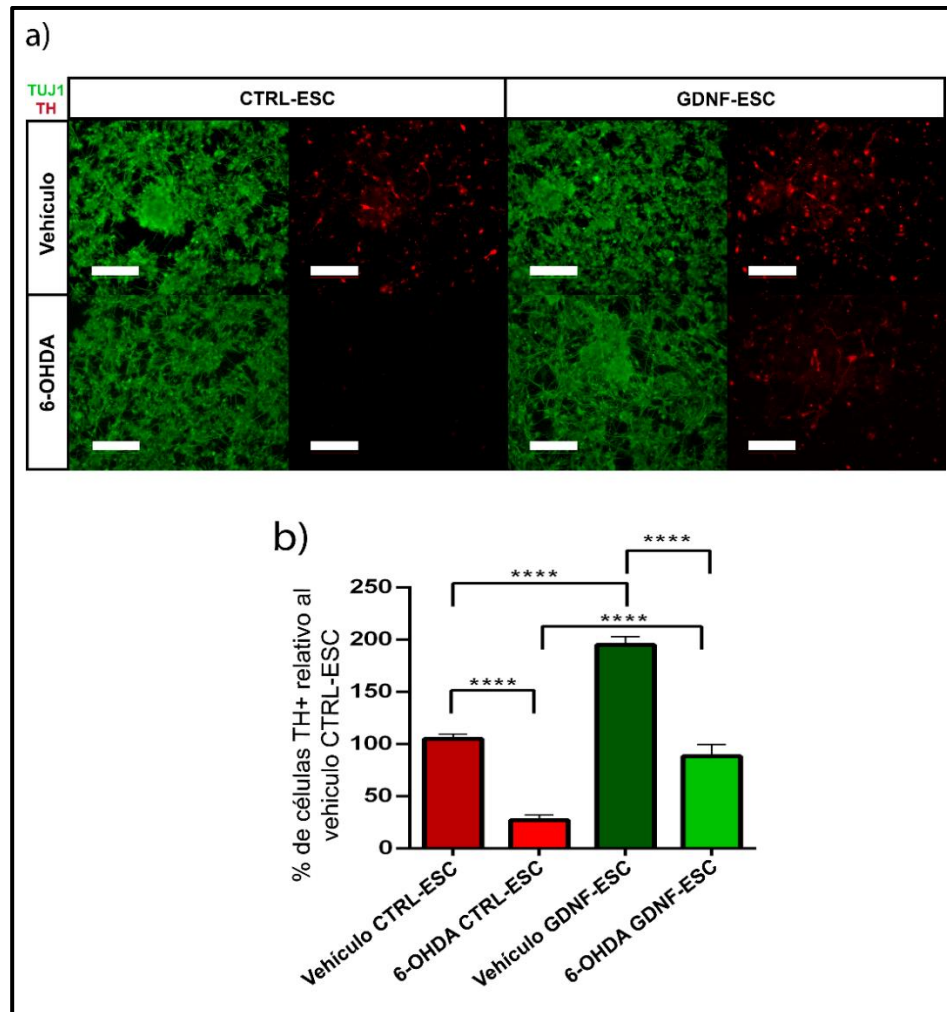
Otros efectos de la sobreexpresión de GDNF fueron observados en otras etapas de diferenciación, como el aumento de tamaño de los EBs en la línea GDNF-ESC cuando eran comparados con los EBs de la línea CTRL-ESC (Figura 4a,b), tres días después de iniciar la etapa; además, durante la etapa 3, se observó una mayor velocidad de migración de las células NESTINA positivas fuera del EB en la línea GDNF-ESC (Figura 4c,d) dos días después de iniciar la etapa. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de GDNF aumenta la eficiencia de diferenciación a NDAs mediante diferentes mecanismos en las etapas tempranas de diferenciación.



**Figura 4.** Efectos del GDNF en otras etapas de la diferenciación dopaminérgica. En a), EBs formados de las líneas CTRL-ESC y GDNF en el día 3 de la etapa 2 del protocolo de diferenciación. Barra de escala = 1 mm. En b), cuantificación del diámetro de los EBs en milímetros, mostrando un incremento significativo del tamaño de los EBs en las células GDNF-ESC comparadas con el control; datos de 5 experimentos independientes. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . En c), se muestran imágenes representativas de las células NESTINA positivas migrando fuera del EB en el segundo día de la etapa 3 de diferenciación. En d), la cuantificación de la distancia recorrida por las células NESTINA<sup>+</sup> fuera

del EB. Las células GDNF-ESC mostraron una diferencia significativa en la distancia recorrida fuera del EB en comparación con las células CTRL-ESC. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Resultados de 3 experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Para comprobar que el GDNF transgénico tenía un efecto neurotrófico en las NDAs diferenciadas de mESC, las células fueron sometidas a un reto tóxico con la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA. Los cultivos diferenciados de 20 días fueron tratados con vehículo o con 200  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA por dos horas, para 24 horas después ser evaluadas mediante inmunocitoquímica. En la línea CTRL-ESC, la 6-OHDA causó una disminución significativa del número de células TH positivas, sobreviviendo únicamente el 27%, relativo al vehículo de incubación. En contraste, las células GDNF-ESC fueron significativamente menos sensibles a esta toxina, ya que se encontró que el 48% de las células TH positivas había sobrevivido, relativo al vehículo (Figura 5a,b). Esta neuroprotección también fue observada por el incremento significativo del porcentaje de área TH positiva, normalizada por TUJ1: CTRL-ESC con 6-OHDA =  $9.0 \pm 1.5\%$ ; GDNF-ESC con 6-OHDA =  $54.2 \pm 6.6\%$ ;  $n = 4$ ,  $p < 0.0001$ . Sumados, estos resultados muestran que el GDNF transgénico incrementa la proporción de NDAs y confiere resistencia ante un reto citotóxico por 6-OHDA.



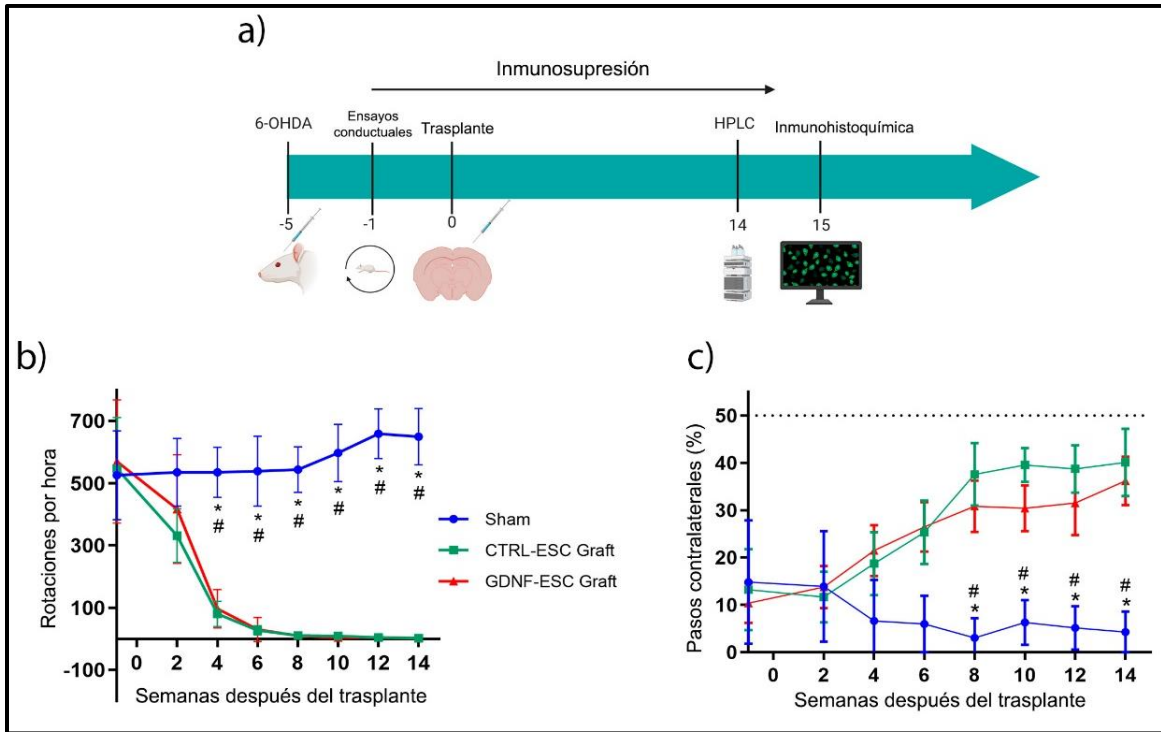
**Figura 5.** La sobreexpresión de GDNF promueve la supervivencia de las neuronas TH positivas después del reto con 6-OHDA. En a), inmunocitoquímica para los marcadores TUJ1 y TH después de la incubación con vehículo por 24 horas (paneles superiores) y después del tratamiento con 6-OHDA (paneles inferiores). Notar que las células GDNF-ESC tienen una mayor proporción de NDAs en el vehículo y después de la 6-OHDA cuando son comparadas con las células CTRL-ESC. En b), cuantificación del porcentaje de células TH positivas a los 20 días de diferenciación, relativo al tratamiento con vehículo de CTRL-ESC, el cual es considerado el 100%. Los resultados son de cuatro experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

### 10.3 El trasplante de las NDAs derivadas de mESC en el estriado promueve recuperación conductual en ratas hemiparkinsonianas.

La funcionalidad de las NDAs diferenciadas *in vitro* puede ser medida por el trasplante intraestriatal en ratas lesionadas con 6-OHDA. Para investigar si estas líneas transgénicas podían inducir una recuperación conductual en ratas hemiparkinsonianas, se llevó a cabo un protocolo de lesión unilateral con 6-OHDA, seguido de pruebas conductuales farmacológicas y no farmacológicas, para posteriormente realizar el trasplante de las NDAs, llevar a cabo una evaluación conductual y una evaluación bioquímica mediante HPLC y,

finalmente, un análisis de inmunohistoquímica para detectar las células trasplantadas en el estriado (Figura 6a).

Con la finalidad de medir la recuperación conductual de las ratas hemiparkinsonianas se usaron las pruebas de rotaciones inducidas por apomorfina y el ajuste de paso. Se consideró una lesión exitosa cuando los animales presentaba una asimetría rotacional inducida por apomorfina de más de 350 giros contralaterales al sitio de lesión en una hora y, para la prueba de ajuste de paso, se consideró a un animal lesionado cuando el uso de la pata contralateral al sitio de lesión fue menor al 30%. Las ratas lesionadas fueron trasplantadas con  $5 \times 10^5$  células de obtenidas de cultivos en diferenciación (día 18) de las líneas CTRL-ESC o GDNF-ESC; además, a otro grupo de ratas se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico inyectándoles medio N2 (grupo sham). Los valores basales en la prueba de rotaciones inducidas por apomorfina previo a el trasplante fueron:  $526 \pm 142$  giros/hora para el grupo de animales sham;  $546 \pm 164$  giros/hora para el grupo de animales CTRL-ESC;  $570 \pm 180$  giros/hora para los animales GDNF-ESC. Para la prueba de ajuste de paso los valores basales fueron:  $14.34 \pm 10.24\%$  para el grupo de animales sham;  $11.78 \pm 6.5\%$  para el grupo de animales CTRL-ESC;  $10.37 \pm 4.1\%$  para el grupo de animales GDNF-ESC. Los trasplantes de las células CTRL-ESC o GDNF-ESC mostraron una recuperación significativa en la prueba de rotaciones (Figura 6b) a partir de la semana 4 post-trasplante y se mantuvo hasta la semana 14 ( $2 \pm 2.49$  giros/hora CTRL-ESC;  $1.6 \pm 0.6$  giros/hora GDNF-ESC). En la prueba de ajuste de paso se observó una corrección de la asimetría en el uso de la pata delantera (Figura 6c) en las ratas trasplantadas con las células CTRL-ESC ( $40 \pm 7.1\%$ ) o GDNF-ESC ( $36.2 \pm 5.1\%$ ). No se observó recuperación conductual en las ratas con procedimiento sham en ninguna de las dos pruebas.

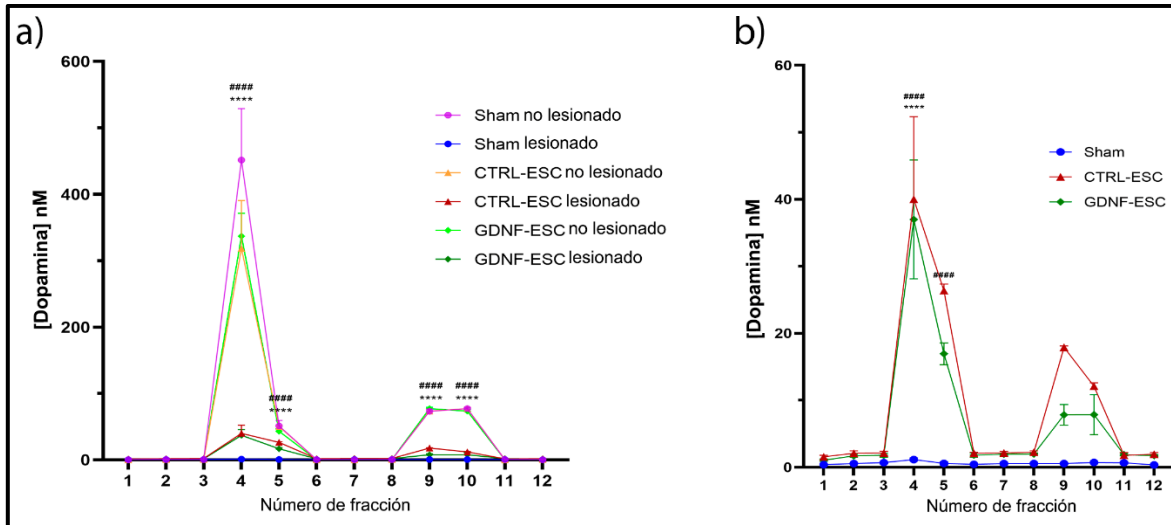


**Figura 6.** Evaluación conductual de las ratas hemiparkinsonianas después del trasplante. En a), un esquema del protocolo de los experimentos *in vivo*. En b), rotaciones inducidas por apomorfina en los animales recibiendo los tratamientos Sham, CTRL-ESC o GDNF-ESC y seguidos por 14 semanas post-trasplante. En c), prueba de ajuste de pasos. Se muestra una recuperación significativa del uso de la extremidad anterior en los animales trasplantados cuando se comparan con los animales Sham. La línea punteada representa el % de uso de la extremidad delantera de un animal no lesionado. \* $p < 0.05$  vs CTRL-ESC; # $p < 0.05$  vs GDNF-ESC. El número de animales en cada grupo fue: 8 para Sham, 7 para ESC-ESC y 7 para GDNF-ESC.

#### 10.4 El trasplante de NDAs promueve la liberación de DA en el estriado.

Para correlacionar la recuperación conductual con la liberación de DA en el estriado de los animales trasplantados, se midieron los niveles de DA en esta región por medio de microdiálisis y dos estimulaciones farmacológicas aplicadas a través de la cánula: (A) una despolarización inducida por iones de  $K^+$  (medio isoosmótico con 100 mM de KCl) y (B) administración de 30  $\mu$ M de anfetamina, la cual induce la liberación de DA vía el transportador de DA. Como control, los lados no lesionados de los animales mostraron un incremento significativo de liberación de DA, comparado con los niveles basales; además, se observó una acumulación significativa de DA después de la aplicación de anfetamina a través de la membrana de diálisis (Figura 7a). De manera que los trasplantes intraestriatales de NDAs derivadas de las células CTRL-ESC y GDNF-ESC, también mostraron liberación de DA después de la estimulación con alto  $K^+$  y anfetamina en el estriado *in vivo*, relacionado con los datos de conducta. Por el contrario, los lados lesionados de las ratas Sham no mostraron un incremento significativo de DA (Figura 7a,b).

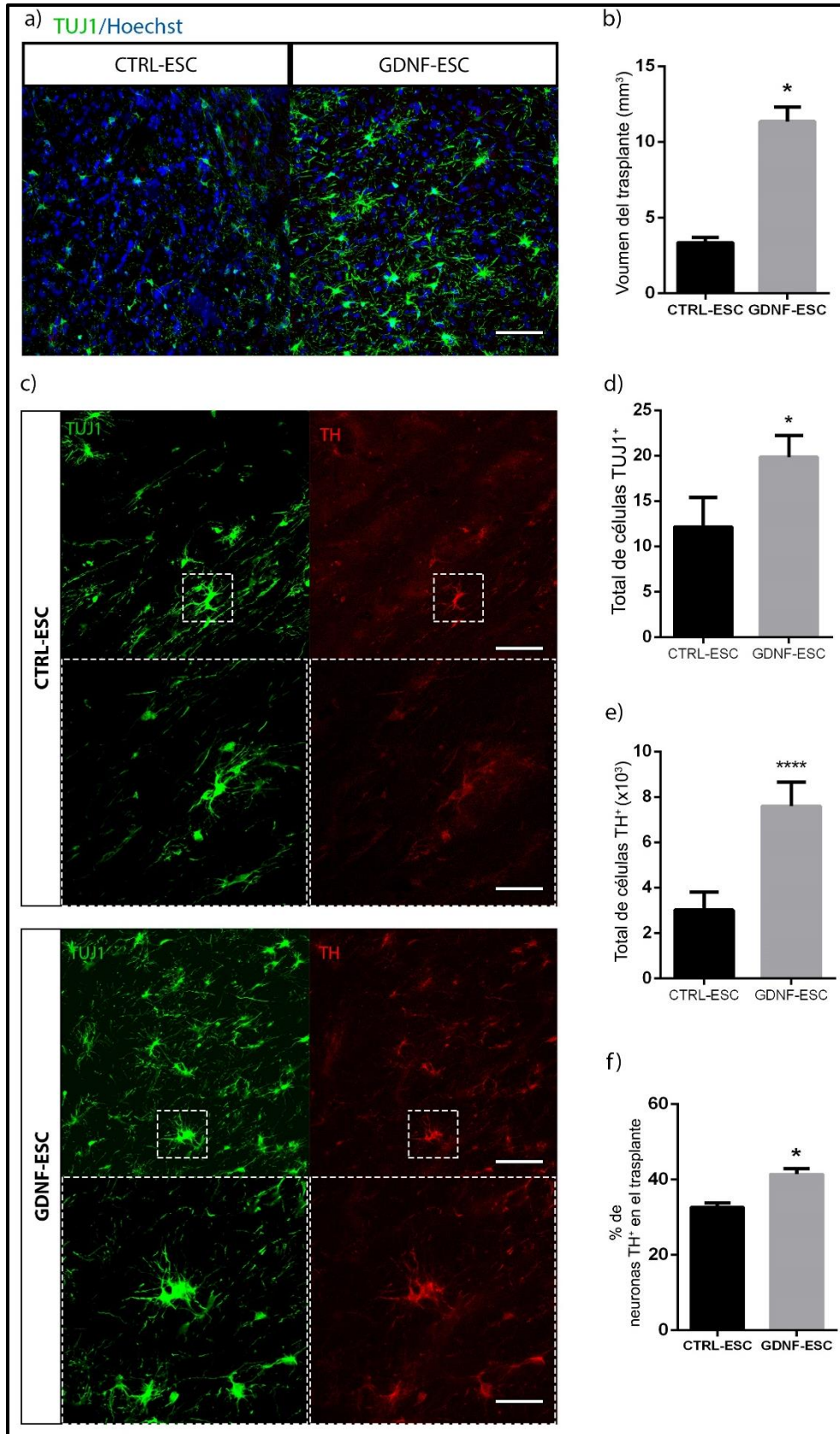




**Figura 7.** Cuantificación de DA liberada *in vivo* en animales lesionados y trasplantados con CTRL-ESC y GDNF-ESC, 14 semanas después del trasplante. En a), concentraciones de DA medidas por microdiálisis y detección por HPLC en condiciones basales (fracciones 1-3), después medio isoosmótico con 100 mM KCl (fracción 4) y, finalmente, 30  $\mu$ M de anfetamina (fracción 9) en los lados lesionados y no lesionados de animales sham y trasplantados. En b), amplificación de los niveles de DA mostrados en el panel a) para los lados lesionados en animales trasplantados con CTRL-ESC, GDNF-ESC o Sham;  $n = 5$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs fracción 3 u 8 en CTRL-ESC y #####  $p < 0.0001$  vs fracción 3 u 8 en GDNF-ESC.

### 10.5 Distribución de las NDAs derivadas de CTRL-ESC Y GDNF-ESC después del trasplante.

Con el propósito de probar si el GDNF es capaz de promover la supervivencia de las NDAs, se analizó el número de células TH positivas en el estriado trasplantado de los animales mediante conteos estereológicos. Las neuronas generadas de las líneas CTRL-ESC y GDNF-ESC se integraron y sobrevivieron en el estriado de los animales trasplantados, 14 semanas después del trasplante. De forma interesante, el volumen del trasplante de las células GDNF-ESC fue significativamente mayor cuando fue comparado con las células CTRL-ESC (Figura 8a,b) y el número total de células TUJ1 positivas se incrementó (Figura 8c,d). El número total de NDAs en el estriado, proveniente de los animales trasplantados con células GDNF-ESC fue significativamente mayor (Figura 8e). Además, el porcentaje de células que expresaban el marcador dopaminérgico TH en los trasplantes con NDAs derivadas de la línea GDNF-ESC fue significativamente mayor comparado con las NDAs de las células control (Figura 8f), indicando que el GDNF puede promover la supervivencia de NDAs después del trasplante. Estos resultados fueron confirmados midiendo el porcentaje de área marcado por TH en ambos grupos: CTRL-ESC =  $16.2 \pm 0.8\%$  vs. GDNF-ESC =  $22.7 \pm 1.0$  ( $p < 0.001$  después de una comparación con *t*-test;  $n = 7$ ). No se observaron somas de células TUJ1 o TH positivas en los animales con el tratamiento Sham (datos no mostrados).



**Figura 8.** Trasplante de NDAs derivadas CTRL-ESC y GDNF-ES en el estriado de animales lesionados. En a) inmunohistoquímica para TUJ1 en el estriado de animales trasplantados a las 14 semanas después del trasplante. Barra de escala = 100  $\mu$ m. En b) cuantificación del volumen del trasplante medido después de la inmunotinción de TUJ1 en 12 rebanadas para ambos grupos. En c), Inmunohistoquímica para TUJ1 y TH en el estriado de los animales trasplantados. Los trasplantes con GDNF-ESC muestran un aumento en el número de células TH positivas. Barra de escala = 100  $\mu$ m. En los paneles superiores se muestra una amplificación del área punteada en los paneles superiores. Barra de escala = 35  $\mu$ m. En d), se muestra la cuantificación del número total de células TUJ1 positivas en las células CTRL-ESC y GDNF-ESC. En e), cuantificación del número total de células TH positivas en los trasplantes con CTRL-ESC y GDNF-ESC. En f), cuantificación del porcentaje de neuronas TH positivas en el estriado de los animales trasplantados, calculado de la siguiente forma: [número total de somas TH positivos/número total de somas TUJ1 positivos] $\times$ 100. Los resultados mostrados son de 7 animales trasplantados para CTRL-ESC y 7 animales trasplantados para GDNF-ESC. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## XII. DISCUSIÓN

Este trabajo se describe un efecto positivo de la secreción continua de GDNF en la diferenciación de NDAs del cerebro medio y, además, un efecto neurotrófico autócrino cuando las células transgénicas eran expuestas a 6-OHDA. Las NDAs derivadas de GDNF-ESC fueron trasplantadas en ratas lesionadas e indujeron una recuperación conductual, así como liberación de dopamina en el estriado, similar a las líneas CTRL-ESC, pero con un incremento en el número de NDAs supervivientes en el estriado, indicando que la liberación continua de GDNF no causa efectos no deseados y promueve la supervivencia de NDAs después del trasplante.

En este trabajo, hemos caracterizado una línea de mESC que expresan y liberan de forma constitutiva GDNF, un fuerte factor neurotrófico que promueve la supervivencia y maduración de NDAs (Lin et al., 1993; Sauer et al., 1995; Åkerud et al., 2001). Esta línea celular que secreta GDNF, se diferencia de forma más eficiente a NDAs en comparación con la línea control CTRL-ESC. A pesar de que estas células en su estadio pluripotente expresan los receptores a GDNF, en nuestros experimentos, los factores asociados a pluripotencia tales como Oct4, Sox2 y Nanog no fueron alterados, sugiriendo que las células permanecen en un estado pluripotente. Es bien sabido que el GDNF es un fuerte inductor de la proliferación y diferenciación del sistema nervioso entérico y de los precursores del ganglio parasimpático *in vivo* (Enomoto et al., 2000; Rossi et al., 2000; Airaksinen and Saarma, 2002; Gianino, 2003; Cortés et al., 2016); sin embargo, su rol en la diferenciación temprana de NDAs diferenciadas de mESC *in vitro* no es claro aún. La ventaja de este modelo de diferenciación es que se pueden separar las etapas y estudiarlas de manera independiente para analizar los posibles efectos de inducción que tendría el GDNF durante el protocolo. Durante la etapa dos, por ejemplo, comienza un proceso de proliferación y especificación de linaje promovido por la formación de agregados celulares conocidos como EBs. Estas estructuras son generadas de forma muy sencilla, removiendo las células del medio que las mantiene en estado pluripotente y cultivándolas en suspensión en placas no adherentes, generando EBs con diferentes formas y tamaños. De forma interesante, durante la formación de los EBs, el tamaño de los agregados celulares aumentó significativamente en las células que expresaban el GDNF. Es sabido que el tamaño de los EBs tiene un impacto en los linajes que se generan, debido a los cambios en la señalización mediados por las fuerzas mecánicas o expresión de receptores de membrana (Hwang et al., 2009b; Livigni et al., 2009; Brickman and Serup, 2017) sugiriendo que el GDNF podría tener un impacto en la generación o proliferación de los precursores neurales al alterar el tamaño de los EBs. Asociado a esto, el número de células NESTINA positivas migrando fuera del EB durante los primeros dos días de la etapa 3, fue significativamente mayor en GDNF-ESC, esto podría sugerir que el GDNF puede tener un impacto positivo no solo en la supervivencia sino que estaría induciendo un compromiso neural dopaminérgico desde la etapa de precursores, tal como se ha visto en otros tipos neuronales como las motoneuronas (Lamas et al., 2014; Cortés et al., 2016, 2017) y con otros factores de crecimiento en el cerebro medio en

desarrollo (Engele, 1998). La población celular que es responsiva a GDNF en los EBs y el mecanismo activado por este factor neurotrófico permanecen aún como preguntas abiertas que requieren otros experimentos para ser resueltas. Sin embargo, se sabe que este efecto de inducción es causado por el GDNF ya que al agregar GDNF recombinante en líneas control, seguido de un tratamiento con anticuerpos anti-GDNF, la actividad de este factor se ve abolida en motoneuronas (Cortés et al., 2016). Este efecto de añadir GDNF recombinante podría ser sustituido o cambiado por la adición de medio condicionado de las células que expresan el GDNF de forma constitutiva a células CTRL-ESC para observar si los efectos del incremento de NDAs, el cambio en el tamaño de los EBs y el aumento de la migración se producen en esta línea control, por lo cual sería un interesante experimento a realizar.

La mayoría de los protocolos de diferenciación de células pluripotentes a linajes dopaminérgicos incluyen GDNF como parte de la suplementación del medio, especialmente en las etapas finales para aumentar la supervivencia de las células TH positivas, además de algunos otros factores como BDNF o neurotrofinas (Lee et al., 2000; Kriks et al., 2011; Kirkeby et al., 2017). Para este trabajo, el GDNF autocrino fue el único factor neurotrófico utilizado en la parte final de la diferenciación, por lo que los efectos de maduración y supervivencia se pueden asociar únicamente a esta molécula. Las células que expresaron GDNF durante todo el protocolo de diferenciación mostraron un incremento en el número de células TH positivas vs. la línea CTRL-ESC. De hecho, otros marcadores mesencefálicos importantes para la especificación a NDAs también se incrementaron, tales como LMX1a, LMX1b y FOXA2 (Engele, 1998; Kittappa et al., 2007; Gale and Li, 2008; Hegarty et al., 2013). En el cerebro medio hay dos poblaciones dopaminérgicas: las neuronas del área tegmental ventral (VTA) las cuales expresan calbindina y las que se encuentran en la SNpc positivas para el marcador Girk2, el cual es un canal rectificador de potasio regulado por proteínas G (Inanobe et al., 1999; Neuhoff et al., 2002; Roeper, 2013). Se midieron las proporciones de células calbindina positivas y GIRK2 positivas y se encontró que el número de ambos tipos dopaminérgicos se incrementó significativamente, indicando que ambos tipos celulares se ven influenciados por el efecto neurotrófico de esta molécula. Esto es debido a que ambos tipos celulares poseen los receptores a GDNF y llevan a cabo los mismos mecanismos de señalización (Treanor et al., 1996; Trupp et al., 1997; Wang et al., 2010). Como se reportó previamente, el GDNF puede proveer señales de supervivencia a diferentes nichos de neuronas como simpáticas, entéricas, motoras y otras neuronas catecolinérgicas, tales como las noradrenérgicas (Lin et al., 1993; Culpier and Ibáñez, 2004; Pascual et al., 2008; Cortés et al., 2016; Ito and Enomoto, 2016; Enterría-Morales et al., 2020b, 2020a). De forma interesante, la proporción de neuronas serotoninérgicas diferenciadas no cambió en las células GDNF-ESC (datos no mostrados). Esto sugiere que el GDNF puede incrementar el número de NDAs derivadas de ESC promoviendo la supervivencia, pero también teniendo un efecto como un inductor de diferenciación y maduración dopaminérgica.

Las NDAs diferenciadas de las células GDNF-ESC fueron más resistentes al reto citotóxico con 6-OHDA *in vitro*, como era de esperarse debido al efecto neuroprotector del GDNF descrito previamente (Lin et al., 1993; Sauer et al., 1995; Meka et al., 2015; Drinkut et al., 2016). Sin embargo, este efecto solo se había observado cuando el GDNF recombinante era agregado al medio (Meyer et al., 2001) o cuando las NDAs era co-cultivadas con células que secretaban este factor neurotrófico (Åkerud et al., 2001), pero no cuando la misma población celular estaba produciendo el GDNF. Este tipo de sistemas podría generar un efecto autocrino en NDAs diferenciadas, incrementando la supervivencia celular *in vitro* o *in vivo*, especialmente después del trasplante en modelos animales de la EP, en donde la adición de GDNF a las neuronas trasplantadas que no expresaran este factor sería complicado (Zurn et al., 2001). Usando este método de expresión autocrina se evitaría usar métodos que requieran un co-trasplante alogénico o métodos de expresión mediado por virus, tales como el sistema AAV2 (Kells et al., 2012b; Tenenbaum and Humbert-Claude, 2017) que podrían generar efectos contraproducentes a largo plazo. Algunos trabajos recientes han mostrado que el co-trasplante de NDAs con sistemas que secretan GDNF de forma constitutiva (Gantner et al., 2020) o regulada (Perez-Bouza et al., 2017b; Widmer, 2018) pueden promover una recuperación conductual en modelos animales de la EP; sin embargo, como se mencionó anteriormente, ninguno de estos sistemas expresa el GDNF de forma autocrina y se requiere de otro tipo celular para expresar el factor neurotrófico, tales como células mesenquimales, mioblastos o una infusión directa de GDNF (Yurek, 1998; Wyse et al., 2014).

La pérdida de DA en el estriado resulta en la pérdida de la función motora, lo que produce un respuesta patológica como el temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad en la postura en los pacientes con EP (Dauer and Przedborski, 2003). Actualmente, la suplementación farmacológica de DA es la estrategia más usada para reducir los síntomas de la EP. El trasplante de NDAs se ha utilizado ampliamente en modelos animales de la EP y en algunas pruebas clínicas (Kordower et al., 1995a, 2017; Piccini et al., 1999). El protocolo más utilizado consiste en el trasplante ectópico de NDAs saludables en el estriado de pacientes con la EP; sin embargo, esta técnica no ha arrojado resultados satisfactorios en las pruebas clínicas por muchas razones, una de ellas es el número de neuronas que sobreviven después del trasplante y el número de neuritas que se extienden dentro de los mismos (Björklund and Lindvall, 2000; Brundin et al., 2010). Por esta razón han emergido nuevas estrategias que se enfocan en prevenir la pérdida progresiva de las neuronas en etapas tempranas de la enfermedad usando factores neurotróficos como herramienta terapéutica (Axelsen and Woldbye, 2018; Nasrolahi et al., 2018; Gouel et al., 2019b; Wang et al., 2020a). Aun con esto, los métodos terapéuticos usando GDNF han mostrado limitaciones serias, por ejemplo, el GDNF no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que su administración debe de ser localizada ya sea en el estriado (Bilang-Bleuel et al., 1997; Kirik et al., 2000), en la SNpc (Choi-Lundberg et al., 1997; Bensadoun et al., 2000) o en ambos sitios (Kirik et al., 2000; Kordower et al., 2000); además,

en pruebas clínicas de ensayos a doble ciego, los pacientes que recibieron tratamiento con GDNF no mostraron mejoría en los síntomas motores (Whone et al., 2019a, 2019b).

Por esta razón, en este trabajo se utilizó la terapia de remplazo celular y la administración de GDNF de forma combinada para comprobar la supervivencia de las NDAs de ratas hemiparkinsonianas trasplantadas. Por trabajos anteriores, se sabe que la inyección de 6-OHDA resulta en una pérdida aguda y severa de NDAs de la SNpc dando como resultado un déficit conductual medido por rotaciones inducidas por apomorfina (Ungerstedt, 1968; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). En este trabajo se demostró que el trasplante de NDAs derivadas de ESC que expresan GDNF de forma constitutiva puede promover una recuperación conductual en animales que fueron previamente lesionados con 6-OHDA, medido tanto por una prueba farmacológica como por una no farmacológica. Es de llamar la atención que no se observaron diferencias en el tiempo de recuperación entre las células control y las que expresaban GDNF. Según lo reportado, el trasplante de NDAs derivadas de ESC en el estriado dorsal promueve la recuperación conductual después de 4 semanas después del trasplante de células provenientes de ratón y 12 semanas para células provenientes de humanos (Chung et al., 2002; Kim et al., 2002; Kriks et al., 2011; Díaz-Martínez et al., 2013; Kirkeby et al., 2017; Gantner et al., 2020). Un resultado interesante fue que la expresión continua de GDNF en el trasplante no promovió un crecimiento celular descontrolado, pues el aspecto del trasplante en ambas líneas celulares fue similar, aunque el volumen en los trasplantes GDNF-ESC fue mayor.

El trasplante de NDAs diferenciadas de mESC o hESC pueden incrementar los niveles de DA en el estriado trasplantado de animales lesionados sin la necesidad de una sobreexpresión de GDNF (Piccini et al., 1999; Rodríguez-Gómez et al., 2007; Díaz-Martínez et al., 2013), sin llegar a alcanzar los niveles basales de los lados no lesionados. En este trabajo, se esperaba que los niveles de DA en el estriado se incrementaran en los animales trasplantados con GDNF-ESC comparado con los animales trasplantados con las células control. De forma interesante, los niveles de DA en el estriado de los animales trasplantados fueron mayores cuando se compararon con los animales sham, pero no se observó ninguna diferencia significativa entre los trasplantes con CTRL-ESC y GDNF-ESC. Es sabido que el GDNF es un fuerte regulador de la excitabilidad en NDAs (Yang et al., 2001) y un regulador de la síntesis de DA, incrementando la liberación mediante dos mecanismos: la inhibición de canales de  $K^+$ , promoviendo la despolarización de las neuronas y entrada de  $Ca^{2+}$  (Hebert et al., 1996; Bourque and Trudeau, 2000; Yang et al., 2001) o por la reducción de la actividad de DAT (Airavaara et al., 2004; Boger et al., 2007; Littrell et al., 2012; Barroso-Chinea et al., 2016). Es de llamar la atención que en la mayoría de estos trabajos mencionan que el GDNF promueve la expresión de DA a la alta, sin embargo, en algunos otros trabajos la expresión sostenida de GDNF induce una regulación a la baja de DA, alterando los niveles de mRNA de *TH* como mecanismo compensatorio y, por lo tanto, una notable disminución de la actividad dopaminérgica (Georgievska et al., 2002; Yang et al., 2009; Barroso-Chinea et al., 2016; Chtarto et al., 2016; Tenenbaum and Humbert-Claude, 2017). Es por esta razón que

la concentración y expresión del GDNF debería ser idealmente regulada en trabajos futuros para evitar mecanismos compensatorios no deseados y prevenir la desregulación de liberación de DA en trasplante de NDAs derivadas de ESC.

En este trabajo también se demostró que la expresión sostenida de GDNF incrementa el número de neuronas TH positivas después del trasplante de NDAs derivadas de ESC. Desafortunadamente, este incremento no mostró mejora en el tiempo de recuperación ni incremento de la DA liberada en el estriado, mostrando que la expresión sostenida de este factor neurotrófico no altera los efectos positivos del trasplante de NDAs. Se ha propuesto que la integración y supervivencia de las NDAs en el tejido hospedero es fundamental para la recuperación conductual (Brundin et al., 2000); sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, tanto los trasplantes con células CTRL-ESC y GDNF-ESC, promovían una recuperación conductual similar en los test farmacológicos y no farmacológicos, sugiriendo que el número de NDAs en el trasplante de las células CTRL-ESC es suficiente para mejorar la conducta y la liberación de dopamina en los animales lesionados.

Algunos trabajos recientes han propuesto que la supervivencia celular inducida por GDNF no es necesariamente la clave para mejorar los síntomas motores, si no que son el crecimiento axonal y la formación de espinas dendríticas las dos características necesarias para una mejor recuperación (Clavreul et al., 2006; Grealish et al., 2014; Perez-Bouza et al., 2017a). Además, Gantner y colaboradores demostraron que el momento en el que el GDNF es administrado durante el trasplante determina qué tan eficiente será el crecimiento axonal y la recuperación conductual en las pruebas no farmacológicas (Gantner et al., 2020). En este trabajo no se analizó de forma cuantitativa el crecimiento axonal, sin embargo, no se observaron somas o axones muy alejados de la zona de trasplante. De forma interesante, sí se observó que el volumen del trasplante fue mayor, lo que podría indicar que hay una mayor población de NDAs con prolongaciones, pero que estas se mantienen dentro del sitio del trasplante y no se extienden hacia otras regiones del estriado. Esto podría estar asociado al efecto conocido como “efecto de tienda de dulces” o “*candy store effect*” (Santosa et al., 2013; Marquardt et al., 2015), en donde los axones únicamente crecen hacia donde se encuentra la mayor concentración de GDNF.

En resumen, este trabajo permitió mostrar evidencia de que: (1) el GDNF transgénico no afecta la pluripotencia de las células mESC; (2) los efectos positivos de la expresión y liberación constitutiva de GDNF en la diferenciación dopaminérgica *in vitro*; (3) las GDNF-ESC son menos sensibles a la acción citotóxica de la 6-OHDA; (4) después del trasplante, tanto la línea CTRL-ESC como la línea GDNF-ESC inducen una recuperación conductual y en los niveles de DA liberada en el estriado lesionado de las ratas hemiparkinsonianas; (5) el GDNF incrementa la supervivencia de las NDAs derivadas de células GDNF-ESC en modelos de la EP usando roedores. A pesar de que las células CTRL-ESC puede promover una recuperación conductual en animales lesionados después de



recibir un trasplante, el número de células TH positivas es menor que en los trasplantes usando las células GDNF-ESC. Esta diferencia en el número de células no tiene un efecto que favorezca las pruebas de conducta ni la liberación de DA medida por HPLC. Estos resultados sugieren que se necesita una mejor estrategia para administrar el GDNF en los trasplantes de NDAs. Una de estas estrategias es el uso de sistema de expresión regulada mediada por tetraciclinas, el cual ha probado ser efectivo en ESC tanto de humano como de ratón (Marquardt et al., 2015; T. Das et al., 2016; Guo et al., 2017; Bara et al., 2018; Ge et al., 2018).

### XIII. REFERENCIAS

- Agarwal, S., Holton, K. L., and Lanza, R. (2008). Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1117–1127. doi:10.1634/stemcells.2007-1102.
- Airaksinen, M. S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394. doi:10.1038/nrn812.
- Airavaara, M., Planken, A., Gäddnäs, H., Piepponen, T. P., Saarma, M., and Ahtee, L. (2004). Increased extracellular dopamine concentrations and FosB/DeltaFosB expression in striatal brain areas of heterozygous GDNF knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2336–2344. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03700.x.
- Akerud, P., Canals, J. M., Snyder, E. Y., and Arenas, E. (2001). Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 8108–8118. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-20-08108.2001.
- Åkerud, P., Canals, J. M., Snyder, E. Y., and Arenas, E. (2001). Neuroprotection through Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor by Neural Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 21, 8108–8118. doi:10.1523/jneurosci.21-20-08108.2001.
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., et al. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* 227, 271–278. doi:10.1006/dbio.2000.9912.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., et al. (2006). Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell* 124, 393–405. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.037.
- Andrews, P. W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 357, 405–417. doi:10.1098/rstb.2002.1058.
- Ang, S.-L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133, 3499–3506. doi:10.1242/dev.02501.
- Aoki, H., Hara, A., Niwa, M., Yamada, Y., and Kunisada, T. (2009). In vitro and in vivo differentiation of human embryonic stem cells into retina-like organs and comparison with that from mouse pluripotent epiblast stem cells. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 2266–2279. doi:10.1002/dvdy.22008.
- Axelsen, T. M., and Woldbye, D. P. D. (2018). Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update. *J. Parkinsons. Dis.* Preprint, 1–21. doi:10.3233/jpd-181331.
- Bara, J. J., Dresing, I., Zeiter, S., Anton, M., Daculsi, G., Eglin, D., et al. (2018). A doxycycline inducible, adenoviral bone morphogenetic protein-2 gene delivery system to bone. *J.*

*Tissue Eng. Regen. Med.* 12, e106–e118. doi:10.1002/term.2393.

- Barker, R. A., Drouin-Ouellet, J., and Parmar, M. (2015). Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 492–503. doi:10.1038/nrneuro.2015.123.
- Barker, R. A., Parmar, M., Studer, L., and Takahashi, J. (2017). Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson’s Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell* 21, 569–573. doi:10.1016/j.stem.2017.09.014.
- Barroso-Chinea, P., Cruz-Muros, I., Afonso-Oramas, D., Castro-Hernández, J., Salas-Hernández, J., Chtarto, A., et al. (2016). Long-term controlled GDNF over-expression reduces dopamine transporter activity without affecting tyrosine hydroxylase expression in the rat mesostriatal system. *Neurobiol. Dis.* 88, 44–54. doi:10.1016/j.nbd.2016.01.002.
- Bayerl, J., Ayyash, M., Shani, T., Manor, Y. S., Gafni, O., Massarwa, R., et al. (2021). Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell* 28, 1549-1565.e12. doi:10.1016/j.stem.2021.04.001.
- Bensadoun, J. C., Déglon, N., Tseng, J. L., Ridet, J. L., Zurn, A. D., and Aebischer, P. (2000). Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson’s disease using GDNF. *Exp. Neurol.* 164, 15–24. doi:10.1006/exnr.2000.7409.
- Bespalov, M. M., Sidorova, Y. A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhães, A. C., Kuleskiy, E., et al. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J. Cell Biol.* 192, 153–169. doi:10.1083/jcb.201009136.
- Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert, J. J., Mallet, J., et al. (1997). Intra-striatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8818–8823. doi:10.1073/pnas.94.16.8818.
- Björklund, A., and Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* 3, 537–544. doi:10.1038/75705.
- Boger, H. A., Middaugh, L. D., Patrick, K. S., Ramamoorthy, S., Denehy, E. D., Zhu, H., et al. (2007). Long-term consequences of methamphetamine exposure in young adults are exacerbated in glial cell line-derived neurotrophic factor heterozygous mice. *J. Neurosci.* 27, 8816–8825. doi:10.1523/JNEUROSCI.1067-07.2007.
- Bolte, S., and Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x.
- Bond, A. M., Bhalala, O. G., and Kessler, J. A. (2012). The dynamic role of bone

- morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev. Neurobiol.* 72, 1068–1084. doi:10.1002/dneu.22022.
- Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C., and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum. Reprod.* 9, 2110–2117. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138401.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., et al. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256–259. doi:10.1126/science.1077209.
- Bose, B., Shenoy, S. P., Konda, S., and Wangikar, P. (2012). Human embryonic stem cell differentiation into insulin secreting  $\beta$ -cells for diabetes. *Cell Biol. Int.* 36, 1013–1020. doi:10.1042/CBI20120210.
- Bourque, M. J., and Trudeau, L. E. (2000). GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3172–3180. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00219.x.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 947–956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Brickman, J. M., and Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 6, 1–11. doi:10.1002/wdev.259.
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195. doi:10.1038/nature05950.
- Brundin, D. P., Karlsson, J., Emgård, M., Schierle, G. S. K., Hansson, O., Petersén, Å., et al. (2000). Improving the Survival of Grafted Dopaminergic Neurons: A Review over Current Approaches. *Cell Transplant.* 9, 179–195. doi:10.1177/096368970000900205.
- Brundin, P., Barker, R. A., and Parmar, M. (2010). “Chapter 14 - Neural grafting in Parkinson’s disease: Problems and possibilities,” in *Recent Advances in Parkinson’s Disease*, eds. A. Björklund and M. A. B. T.-P. in B. R. Cenci (Elsevier), 265–294. doi:https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84014-2.
- Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karam, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., et al. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285, 754–756. doi:10.1126/science.285.5428.754.
- Brüstle, O., Spiro, A. C., Karam, K., Choudhary, K., Okabe, S., and McKay, R. D. G. (1997).  $\text{In vitro}$ -generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14809 LP – 14814. doi:10.1073/pnas.94.26.14809.
- Bühnemann, C., Scholz, A., Bernreuther, C., Malik, C. Y., Braun, H., Schachner, M., et al.

- (2006). Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 129, 3238–3248. doi:10.1093/brain/awl261.
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224–227. doi:10.1038/nature10284.
- Cao, J.-P., Wang, H.-J., Yu, J.-K., Yang, H., Xiao, C.-H., and Gao, D.-S. (2008). Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neurosci. Res.* 61, 390–397. doi:10.1016/j.neures.2008.04.008.
- Carlsson, T., Carta, M., Muñoz, A., Mattsson, B., Winkler, C., Kirik, D., et al. (2009). Impact of grafted serotonin and dopamine neurons on development of L-DOPA-induced dyskinesias in parkinsonian rats is determined by the extent of dopamine neuron degeneration. *Brain* 132, 319–335. doi:10.1093/brain/awn305.
- Caspi, O., Huber, I., Kehat, I., Habib, M., Arbel, G., Gepstein, A., et al. (2007). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 1884–1893. doi:10.1016/j.jacc.2007.07.054.
- Cenci, M. A. (2014). Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Front. Neurol.* 5, 242. doi:10.3389/fneur.2014.00242.
- Chambers, I. (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 6, 386–391. doi:10.1089/clo.2004.6.386.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., et al. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655. doi:10.1016/s0092-8674(03)00392-1.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280. doi:10.1038/nbt.1529.
- Cheng, A., Kapacee, Z., Peng, J., Lu, S., Lucas, R. J., Hardingham, T. E., et al. (2014). Cartilage repair using human embryonic stem cell-derived chondroprogenitors. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 1287–1294. doi:10.5966/sctm.2014-0101.
- Cho, M. S., Kim, S. J., Ku, S.-Y., Park, J. H., Lee, H., Yoo, D. H., et al. (2012). Generation of retinal pigment epithelial cells from human embryonic stem cell-derived spherical neural masses. *Stem Cell Res.* 9, 101–109. doi:10.1016/j.scr.2012.05.002.
- Choi-Lundberg, D. L., Lin, Q., Chang, Y. N., Chiang, Y. L., Hay, C. M., Mohajeri, H., et al. (1997). Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275, 838–841. doi:10.1126/science.275.5301.838.

- Christoforou, N., Oskouei, B. N., Estes, P., Hill, C. M., Zimmet, J. M., Bian, W., et al. (2010). Implantation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac progenitor cells preserves function of infarcted murine hearts. *PLoS One* 5, e11536. doi:10.1371/journal.pone.0011536.
- Chtarto, A., Humbert-Claude, M., Bockstael, O., Das, A. T., Boutry, S., Breger, L. S., et al. (2016). A regulatable AAV vector mediating GDNF biological effects at clinically-approved sub-antimicrobial doxycycline doses. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 3, 16027. doi:10.1038/mtm.2016.27.
- Chung, S., Sonntag, K., Andersson, T., Bjorklund, L. M., Park, J., Kim, D., et al. (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1829–1838. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02255.x.
- Clavreul, A., Sindji, L., Aubert-Pouëssel, A., Benoît, J.-P., Menei, P., and Montero-Menei, C. N. (2006). Effect of GDNF-releasing biodegradable microspheres on the function and the survival of intrastriatal fetal ventral mesencephalic cell grafts. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 221–228. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.11.006.
- Coggeshall, R. E., and Lekan, H. A. (1996). Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J. Comp. Neurol.* 364, 6–15. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960101)364:1<6::AID-CNE2>3.0.CO;2-9.
- Collier, T. J., Sortwell, C. E., and Daley, B. F. (1999). Diminished viability, growth, and behavioral efficacy of fetal dopamine neuron grafts in aging rats with long-term dopamine depletion: an argument for neurotrophic supplementation. *J. Neurosci.* 19, 5563–5573. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-13-05563.1999.
- Collier, T. J., Sortwell, C. E., Mercado, N. M., and Steece-Collier, K. (2019). Cell therapy for Parkinson's disease: Why it doesn't work every time. *Mov. Disord.* 34, 1120–1127. doi:10.1002/mds.27742.
- Cortés, D., Carballo-Molina, O. A., Castellanos-Montiel, M. J., and Velasco, I. (2017). The non-survival effects of Glial cell line-derived neurotrophic factor on neural cells. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–13. doi:10.3389/fnmol.2017.00258.
- Cortés, D., Robledo-Arratia, Y., Hernández-Martínez, R., Escobedo-Ávila, I., Bargas, J., and Velasco, I. (2016). Transgenic GDNF positively influences proliferation, differentiation, maturation and survival of motor neurons produced from mouse embryonic stem cells. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 1–16. doi:10.3389/fncel.2016.00217.
- Coulpier, M., and Ibáñez, C. F. (2004). Retrograde propagation of GDNF-mediated signals in sympathetic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 132–139. doi:10.1016/j.mcn.2004.06.001.
- Dai, J.-X., Hu, Z.-L., Shi, M., Guo, C., and Ding, Y.-Q. (2008). Postnatal ontogeny of the transcription factor Lmx1b in the mouse central nervous system. *J. Comp. Neurol.*

- 509, 341–355. doi:<https://doi.org/10.1002/cne.21759>.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease. *Neuron* 39, 889–909. doi:10.1016/S0896-6273(03)00568-3.
- Deb, K. D., and Sarda, K. (2008). Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J. Transl. Med.* 6, 7. doi:10.1186/1479-5876-6-7.
- Deng, X., Liang, Y., Lu, H., Yang, Z., Liu, R., Wang, J., et al. (2013). Co-Transplantation of GDNF-Overexpressing Neural Stem Cells and Fetal Dopaminergic Neurons Mitigates Motor Symptoms in a Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS One* 8, e80880. doi:10.1371/journal.pone.0080880.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., and Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* 283, 9089–9100. doi:10.1074/jbc.M710012200.
- Di Santo, S., and Widmer, H. R. (2018). Neurotrophic factor-based strategies to enhance survival and differentiation of neural progenitor cells toward the dopaminergic phenotype. *Brain Circ.* 4, 139–141. doi:10.4103/bc.bc\_23\_18.
- Díaz-Martínez, N. E., Tamariz, E., Díaz, N. F., García-Peña, C. M., Varela-Echavarría, A., and Velasco, I. (2013). Recovery from experimental Parkinsonism by Semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. *Mol. Ther.* 21, 1579–1591. doi:10.1038/mt.2013.78.
- Dijkstra, A. A., Voorn, P., Berendse, H. W., Groenewegen, H. J., Rozemuller, A. J. M., and van de Berg, W. D. J. (2014). Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 29, 1244–1251. doi:10.1002/mds.25952.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27–45.
- Doğan, A. (2018). Embryonic Stem Cells in Development and Regenerative Medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1079, 1–15. doi:10.1007/5584\_2018\_175.
- Doi, D., Magotani, H., Kikuchi, T., Ikeda, M., Hiramatsu, S., Yoshida, K., et al. (2020). Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 11, 3369. doi:10.1038/s41467-020-17165-w.
- Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., et al. (2014). Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports* 2, 337–350. doi:10.1016/j.stemcr.2014.01.013.
- Drinkut, A., Tillack, K., Meka, D. P., Schulz, J. B., Kügler, S., and Kramer, E. R. (2016). Ret is essential to mediate GDNF's neuroprotective and neuroregenerative effect in a

- Parkinson disease mouse model. *Cell Death Dis.* 7, 1–8. doi:10.1038/cddis.2016.263.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., and McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C723–C742. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010.
- Emmanouilidou, E., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010). Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol. Aging* 31, 953–968. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.008.
- Engel, K., Huckhagel, T., Gulberti, A., Pötter-Nerger, M., Vettorazzi, E., Hidding, U., et al. (2018). Towards unambiguous reporting of complications related to deep brain stimulation surgery: A retrospective single-center analysis and systematic review of the literature. *PLoS One* 13.
- Engel, J. (1998). Spatial and temporal growth factor influences on developing midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 53, 405–414. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19980815)53:4<405::AID-JNR2>3.0.CO;2-A.
- Enomoto, H., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Johnson, E. M., and Milbrandt, J. (2000). Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential actions of GDNF and neurturin. *Development* 127, 4877 LP – 4889. Available at: <http://dev.biologists.org/content/127/22/4877.abstract>.
- Enterría-Morales, D., Del Rey, N. L.-G., Blesa, J., López-López, I., Gallet, S., Prévot, V., et al. (2020a). Molecular targets for endogenous glial cell line-derived neurotrophic factor modulation in striatal parvalbumin interneurons. *Brain Commun.* 2, fcaa105–fcaa105. doi:10.1093/braincomms/fcaa105.
- Enterría-Morales, D., López-López, I., López-Barneo, J., and d'Anglemont de Tassigny, X. (2020b). Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in the Maintenance of Adult Mesencephalic Catecholaminergic Neurons. *Mov. Disord.* 35, 565–576. doi:10.1002/mds.27986.
- Ernsberger, U. (2008). The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons. *Cell Tissue Res.* 333, 353–371. doi:10.1007/s00441-008-0634-4.
- Evans, J. R., and Barker, R. A. (2008). Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 437–447. doi:10.1517/14728222.12.4.437.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. doi:10.1038/292154a0.
- Failli, V., Bachy, I., and Rétaux, S. (2002). Expression of the LIM-homeodomain gene *Lmx1a* (*dreher*) during development of the mouse nervous system. *Mech. Dev.* 118, 225–228. doi:https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00254-X.



- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A. A., Manor, Y. S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., et al. (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504, 282–286. doi:10.1038/nature12745.
- Gale, E., and Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Mol. Brain* 1, 8. doi:10.1186/1756-6606-1-8.
- Gantner, C. W., Luzy, I. R. de, Kauhausen, J. A., Moriarty, N., Niclis, J. C., Bye, C. R., et al. (2020). Viral Delivery of GDNF Promotes Functional Integration of Human Stem Cell Grafts in Parkinson’s Disease. *Cell Stem Cell* 26, 511–526.e5. doi:10.1016/j.stem.2020.01.010.
- Ge, G., Chen, C., Guderyon, M. J., Liu, J., He, Z., Yu, Y., et al. (2018). Regulatable Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in a Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Stem Cells Dev.* 27, 995–1005. doi:10.1089/scd.2018.0030.
- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., and Daley, G. Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427, 148–154. doi:10.1038/nature02247.
- Georgievska, B., Kirik, D., and Björklund, A. (2002). Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp. Neurol.* 177, 461–474. doi:10.1006/exnr.2002.8006.
- Gianino, S. (2003). GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development* 130, 2187–2198. doi:10.1242/dev.00433.
- Gill, S. S., Patel, N. K., Hotton, G. R., O’Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., et al. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.* 9, 589–595. doi:10.1038/nm850.
- Goldman, J. G., and Postuma, R. (2014). Premotor and nonmotor features of Parkinson’s disease. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 434–441. doi:10.1097/WCO.0000000000000112.
- González, M. A. C., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E., and Lamas, M. (2017). *Células troncales: biología y aplicaciones en biomedicina*. Universidad Nacional Autónoma de México Available at: <https://books.google.fr/books?id=9gqGwwEACAAJ>.
- Gouel, F., Rolland, A.-S., Devedjian, J.-C., Burnouf, T., and Devos, D. (2019a). Past and Future of Neurotrophic Growth Factors Therapies in ALS: From Single Neurotrophic Growth Factor to Stem Cells and Human Platelet Lysates. *Front. Neurol.* 10, 835. doi:10.3389/fneur.2019.00835.
- Gouel, F., Rolland, A. S., Devedjian, J. C., Burnouf, T., and Devos, D. (2019b). Past and future of neurotrophic growth factors therapies in ALS: From single neurotrophic growth factor to stem cells and human platelet lysates. *Front. Neurol.* 10, 1–11.

doi:10.3389/fneur.2019.00835.

- Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K. R., Henderson, J. M., and Deisseroth, K. (2009). Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324, 354–359. doi:10.1126/science.1167093.
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramouille, Y., et al. (2014). Human ESC-Derived Dopamine Neurons Show Similar Preclinical Efficacy and Potency to Fetal Neurons when Grafted in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* 15, 653–665. doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017.
- Guo, J., Ma, D., Huang, R., Ming, J., Ye, M., Kee, K., et al. (2017). An inducible CRISPR-ON system for controllable gene activation in human pluripotent stem cells. *Protein Cell* 8, 379–393. doi:10.1007/s13238-016-0360-8.
- Hallett, P. J., Cooper, O., Sadi, D., Robertson, H., Mendez, I., and Isacson, O. (2014). Long-term health of dopaminergic neuron transplants in Parkinson's disease patients. *Cell Rep.* 7, 1755–1761. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.027.
- Harding, A., Cortez-Toledo, E., Magner, N. L., Beegle, J. R., Coleal-Bergum, D. P., Hao, D., et al. (2017). Highly Efficient Differentiation of Endothelial Cells from Pluripotent Stem Cells Requires the MAPK and the PI3K Pathways. *Stem Cells* 35, 909–919. doi:10.1002/stem.2577.
- Harper, J. M., Krishnan, C., Darman, J. S., Deshpande, D. M., Peck, S., Shats, I., et al. (2004). Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7123–7128. doi:10.1073/pnas.0401103101.
- Hay, D. C., Sutherland, L., Clark, J., and Burdon, T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 225–235. doi:10.1634/stemcells.22-2-225.
- Hay, D. C., Zhao, D., Fletcher, J., Hewitt, Z. A., McLean, D., Urruticoechea-Uriguen, A., et al. (2008). Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells* 26, 894–902. doi:10.1634/stemcells.2007-0718.
- Hebert, M. A., Van Horne, C. G., Hoffer, B. J., and Gerhardt, G. A. (1996). Functional effects of GDNF in normal rat striatum: presynaptic studies using in vivo electrochemistry and microdialysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1181–1190.
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M., and O'Keefe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* 379, 123–138. doi:https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014.
- Hirashima, M., Kataoka, H., Nishikawa, S., Matsuyoshi, N., and Nishikawa, S. (1999). Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. *Blood* 93, 1253–1263.

- Huang, K., Maruyama, T., and Fan, G. (2014). The naive state of human pluripotent stem cells: a synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell* 15, 410–415. doi:10.1016/j.stem.2014.09.014.
- Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L. K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., et al. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251–1256. doi:10.1126/science.1083452.
- Hwang, D.-Y., Hong, S., Jeong, J.-W., Choi, S., Kim, H., Kim, J., et al. (2009a). Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *J. Neurochem.* 111, 1202–1212. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06404.x.
- Hwang, N. S., Varghese, S., Lee, H. J., Zhang, Z., Ye, Z., Bae, J., et al. (2008). In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20641–20646. doi:10.1073/pnas.0809680106.
- Hwang, Y.-S., Chung, B. G., Ortmann, D., Hattori, N., Moeller, H.-C., and Khademhosseini, A. (2009b). Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16978 LP – 16983. doi:10.1073/pnas.0905550106.
- Iacono, D., Geraci-Erck, M., Rabin, M. L., Adler, C. H., Serrano, G., Beach, T. G., et al. (2015). Parkinson disease and incidental Lewy body disease: Just a question of time? *Neurology* 85, 1670–1679. doi:10.1212/WNL.0000000000002102.
- Ikeda, R., Kurokawa, M. S., Chiba, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, T., Tadokoro, M., et al. (2004). Transplantation of motoneurons derived from MASH1-transfected mouse ES cells reconstitutes neural networks and improves motor function in hemiplegic mice. *Exp. Neurol.* 189, 280–292. doi:10.1016/j.expneurol.2004.05.040.
- Inanobe, A., Yoshimoto, Y., Horio, Y., Morishige, K. I., Hibino, H., Matsumoto, S., et al. (1999). Characterization of G-protein-gated K<sup>+</sup> channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 19, 1006–1017. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-03-01006.1999.
- Irala, D., Bonafina, A., Fontanet, P. A., Alsina, F. C., Paratcha, G., and Ledda, F. (2016). The GDNF-GFR $\alpha$ 1 complex promotes the development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. *Dev.* 143, 4224–4235. doi:10.1242/dev.140350.
- Ito, K., and Enomoto, H. (2016). Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and pathogenesis. *J. Biochem.* 160, 77–85. doi:10.1093/jb/mvw037.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., et al. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6, 88–95.

- Jankovic, J., and Poewe, W. (2012). Therapies in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 25, 433–447. doi:10.1097/WCO.0b013e3283542fc2.
- Jeziarski, A., Swedani, A., and Wang, L. (2007). Development of hematopoietic and endothelial cells from human embryonic stem cells: lessons from the studies using mouse as a model. *ScientificWorldJournal.* 7, 1950–1964. doi:10.1100/tsw.2007.310.
- Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., et al. (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 1282–1289. doi:10.1038/nbt1014.
- Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., et al. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 4694–4705. doi:10.1523/JNEUROSCI.0311-05.2005.
- Kells, A. P., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K. S. (2012a). Glial-derived neurotrophic factor gene transfer for Parkinson's disease: Anterograde distribution of AAV2 vectors in the primate brain. *Neurobiol. Dis.* 48, 228–235. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.004.
- Kells, A. P., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K. S. (2012b). Glial-derived neurotrophic factor gene transfer for Parkinson's disease: Anterograde distribution of AAV2 vectors in the primate brain. *Neurobiol. Dis.* 48, 228–235. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.004.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., et al. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488–493. doi:10.1038/386488a0.
- Kim, J.-H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., et al. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50–56. doi:10.1038/nature00900.
- Kim, J., Su, S. C., Wang, H., Cheng, A. W., Cassady, J. P., Lodato, M. A., et al. (2011). Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 9, 413–419. doi:10.1016/j.stem.2011.09.011.
- Kirik, D., Rosenblad, C., and Björklund, A. (1998). Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastratial 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Exp. Neurol.* 152, 259–277. doi:10.1006/exnr.1998.6848.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Bjorklund, A., and Mandel, R. J. (2000). Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastratial but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J. Neurosci.* 20, 4686–4700. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-12-04686.2000.
- Kirkeby, A., Nolbrant, S., Tiklova, K., Heuer, A., Kee, N., Cardoso, T., et al. (2017). Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* 20, 135–148.

doi:10.1016/j.stem.2016.09.004.

- Kittappa, R., Chang, W. W., Awatramani, R. B., and McKay, R. D. G. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol.* 5, e325. doi:10.1371/journal.pbio.0050325.
- Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B. J. (1964). MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res.* 24, 1544–1551.
- Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., and Field, L. J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.* 98, 216–224. doi:10.1172/JCI118769.
- Kopra, J., Vilenius, C., Grealish, S., Härma, M.-A., Varendi, K., Lindholm, J., et al. (2015). GDNF is not required for catecholaminergic neuron survival in vivo. *Nat. Neurosci.* 18, 319–322. doi:10.1038/nn.3941.
- Kordower, J. H. (2003). In vivo gene delivery of glial cell line--derived neurotrophic factor for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 Suppl 3, S120-32; discussion S132-4. doi:10.1002/ana.10485.
- Kordower, J. H., Emborg, M. E., Bloch, J., Ma, S. Y., Chu, Y., Leventhal, L., et al. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767–773. doi:10.1126/science.290.5492.767.
- Kordower, J. H., Freeman, T. B., Snow, B. J., Vingerhoets, F. J. G., Mufson, E. J., Sanberg, P. R., et al. (1995a). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 332, 1118–1124. doi:10.1056/NEJM199504273321702.
- Kordower, J. H., Freeman, T. B., Snow, B. J., Vingerhoets, F. J. G., Mufson, E. J., Sanberg, P. R., et al. (1995b). Neuropathological Evidence of Graft Survival and Striatal Reinnervation after the Transplantation of Fetal Mesencephalic Tissue in a Patient with Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* 332, 1118–1124. doi:10.1056/nejm199504273321702.
- Kordower, J. H., Goetz, C. G., Chu, Y., Halliday, G. M., Nicholson, D. A., Musial, T. F., et al. (2017). Robust graft survival and normalized dopaminergic innervation do not obligate recovery in a Parkinson disease patient. *Ann. Neurol.* 81, 46–57. doi:10.1002/ana.24820.
- Krack, P., Volkman, J., Tinkhauser, G., and Deuschl, G. (2019). Deep Brain Stimulation in Movement Disorders: From Experimental Surgery to Evidence-Based Therapy. *Mov. Disord.* 34, 1795–1810. doi:10.1002/mds.27860.
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of

- Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551. doi:10.1038/nature10648.
- Kuai, X. L., Ni, R. Z., Zhou, G. X., Mao, Z. B., Zhang, J. F., Yi, N., et al. (2015). Transplantation of mouse embryonic stem cell-derived oligodendrocytes in the murine model of globoid cell leukodystrophy. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 30. doi:10.1186/s13287-015-0024-2.
- Lacham-Kaplan, O., Chy, H., and Trounson, A. (2006). Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 24, 266–273. doi:10.1634/stemcells.2005-0204.
- Lamas, N. J., Johnson-Kerner, B., Roybon, L., Kim, Y. A., Garcia-Diaz, A., Wichterle, H., et al. (2014). Neurotrophic requirements of human motor neurons defined using amplified and purified stem cell-derived cultures. *PLoS One* 9, e110324. doi:10.1371/journal.pone.0110324.
- Lane, E. L., Brundin, P., and Cenci, M. A. (2009). Amphetamine-induced abnormal movements occur independently of both transplant- and host-derived serotonin innervation following neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 35, 42–51. doi:10.1016/j.nbd.2009.03.014.
- Lang, A. E., Gill, S., Patel, N. K., Lozano, A., Nutt, J. G., Penn, R., et al. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 59, 459–466. doi:10.1002/ana.20737.
- Lee, H., Shamy, G. Al, Elkabetz, Y., Schofield, C. M., Harrision, N. L., Panagiotakos, G., et al. (2007). Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells* 25, 1931–1939. doi:10.1634/stemcells.2007-0097.
- Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., and McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 18, 675–9. doi:10.1038/76536.
- Lensch, M. W., and Mummery, C. L. (2013). From stealing fire to cellular reprogramming: a scientific history leading to the 2012 Nobel Prize. *Stem cell reports* 1, 5–17. doi:10.1016/j.stemcr.2013.05.001.
- LeWitt, P. A., Rezai, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., Flaherty, A. W., Eskandar, E. N., et al. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet. Neurol.* 10, 309–319. doi:10.1016/S1474-4422(11)70039-4.
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., van Westen, D., Lätt, J., et al. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 6544–6549. doi:10.1073/pnas.1605245113.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science (80- )*. 260,

1130–1132. doi:10.1126/science.8493557.

- Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y. E., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., et al. (2009). Foxa1 and Foxa2 function both upstream of and cooperatively with Lmx1a and Lmx1b in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Dev. Biol.* 333, 386–396. doi:https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.006.
- Lindvall, O., and Björklund, A. (2004). Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1, 382–393. doi:10.1602/neurorx.1.4.382.
- Ling, Z. D., Potter, E. D., Lipton, J. W., and Carvey, P. M. (1998). Differentiation of Mesencephalic Progenitor Cells into Dopaminergic Neurons by Cytokines. *Exp. Neurol.* 149, 411–423. doi:https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6715.
- Littrell, O. M., Pomerleau, F., Huettl, P., Surgener, S., McGinty, J. F., Middaugh, L. D., et al. (2012). Enhanced dopamine transporter activity in middle-aged Gdnf heterozygous mice. *Neurobiol. Aging* 33, 427.e1–14. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.013.
- Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakraborty, S., Holekamp, T. F., et al. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6126–6131. doi:10.1073/pnas.97.11.6126.
- Livigni, A., Villegas, S. N., Oikonomopoulou, I., Rahman, A., Morrison, G. M., and Brickman, J. M. (2009). Differentiation of Embryonic Stem Cells into Anterior Definitive Endoderm. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 10, 1G.3.1-1G.3.10. doi:https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01g03s10.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., and McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292, 1389–1394. doi:10.1126/science.1058866.
- Malpartida, A. B., Williamson, M., Narendra, D. P., Wade-Martins, R., and Ryan, B. J. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends Biochem. Sci.* 46, 329–343. doi:10.1016/j.tibs.2020.11.007.
- Marquardt, L. M., Ee, X., Iyer, N., Hunter, D., Mackinnon, S. E., Wood, M. D., et al. (2015). Finely Tuned Temporal and Spatial Delivery of GDNF Promotes Enhanced Nerve Regeneration in a Long Nerve Defect Model. *Tissue Eng. - Part A* 21, 2852–2864. doi:10.1089/ten.tea.2015.0311.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2, 163–172.

doi:10.1016/0092-8674(74)90090-7.

- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1441–1445. doi:10.1073/pnas.72.4.1441.
- McCulloch, E. A., and Till, J. E. (2005). Perspectives on the properties of stem cells. *Nat. Med.* 11, 1026–1028. doi:10.1038/nm1005-1026.
- Mehat, M. S., Sundaram, V., Ripamonti, C., Robson, A. G., Smith, A. J., Borooah, S., et al. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology* 125, 1765–1775. doi:10.1016/j.ophtha.2018.04.037.
- Meka, D. P., Müller-Rischart, A. K., Nidadavolu, P., Mohammadi, B., Motori, E., Ponna, S. K., et al. (2015). Parkin cooperates with GDNF/RET signaling to prevent dopaminergic neuron degeneration. *J. Clin. Invest.* 125, 1873–1885. doi:10.1172/JCI79300.
- Melki, R. (2015). Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases. *J. Parkinsons. Dis.* 5, 217–227. doi:10.3233/JPD-150543.
- Meyer, M., Matarredona, E. R., Seiler, R. W., Zimmer, J., and Widmer, H. R. (2001). Additive effect of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 on rat fetal nigral explant cultures. *Neuroscience* 108, 273–284. doi:https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00418-3.
- Mittermeyer, G., Christine, C. W., Rosenbluth, K. H., Baker, S. L., Starr, P., Larson, P., et al. (2012). Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 23, 377–381. doi:10.1089/hum.2011.220.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Kogure, O., Kuno, S., et al. (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci. Lett.* 300, 179–181. doi:10.1016/s0304-3940(01)01577-4.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., et al. (1999). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270, 45–48. doi:10.1016/s0304-3940(99)00463-2.
- Morrison, S. J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068–1074. doi:10.1038/nature04956.
- Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., and Kamp, T. J. (2012). Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ. Res.* 111, 344–358. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- Nakamura, M., Okano, H., Toyama, Y., Dai, H. N., Finn, T. P., and Bregman, B. S. (2005).



- Transplantation of embryonic spinal cord-derived neurospheres support growth of supraspinal projections and functional recovery after spinal cord injury in the neonatal rat. *J. Neurosci. Res.* 81, 457–468. doi:10.1002/jnr.20580.
- Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098–1101. doi:10.1126/science.8066449.
- Nambu, A., Tokuno, H., Hamada, I., Kita, H., Imanishi, M., Akazawa, T., et al. (2000). Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J. Neurophysiol.* 84, 289–300. doi:10.1152/jn.2000.84.1.289.
- Nasrolahi, A., Mahmoudi, J., Akbarzadeh, A., Karimipour, M., Sadigh-Eteghad, S., Salehi, R., et al. (2018). Neurotrophic factors hold promise for the future of Parkinson’s disease treatment: is there a light at the end of the tunnel? *Rev. Neurosci.* 29, 475–489. doi:10.1515/revneuro-2017-0040.
- Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., and Roeper, J. (2002). I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J. Neurosci.* 22, 1290–1302. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., et al. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–391. doi:10.1016/s0092-8674(00)81769-9.
- Nistor, G. I., Totoiu, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K., and Keirstead, H. S. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 49, 385–396. doi:10.1002/glia.20127.
- Ohnuki, M., and Takahashi, K. (2015). Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 370, 20140367. doi:10.1098/rstb.2014.0367.
- Olanow, C. W. (2015). Levodopa: Effect on cell death and the natural history of Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* 30, 37–44. doi:10.1002/mds.26119.
- Olanow, C. W., Bartus, R. T., Baumann, T. L., Factor, S., Boulis, N., Stacy, M., et al. (2015). Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann. Neurol.* 78, 248–257. doi:10.1002/ana.24436.
- Olanow, C. W., Kordower, J. H., and Freeman, T. B. (1996). Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson’s disease. *Trends Neurosci.* 19, 102–109. doi:10.1016/s0166-2236(96)80038-5.
- Olanow, C. W., Obeso, J. A., and Stocchi, F. (2006). Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson’s disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet.*

- Neurol.* 5, 677–687. doi:10.1016/S1474-4422(06)70521-X.
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L. G., Wurst, W., et al. (2008). Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 135, 3459–3470. doi:10.1242/dev.027003.
- Orkin, S. H. (2005). Chipping away at the embryonic stem cell network. *Cell* 122, 828–830. doi:10.1016/j.cell.2005.09.002.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., et al. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 26, 215–224. doi:10.1038/nbt1384.
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Ralph, G. S., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P. C., et al. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet (London, England)* 383, 1138–1146. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
- Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., et al. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476, 220–223. doi:10.1038/nature10202.
- Paratcha, G., Ledda, F., and Ibáñez, C. F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113, 867–879. doi:10.1016/s0092-8674(03)00435-5.
- Park, J.-S., Davis, R. L., and Sue, C. M. (2018). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18, 21. doi:10.1007/s11910-018-0829-3.
- Parmar, M. (2018). Towards stem cell based therapies for Parkinson's disease. *Development* 145. doi:10.1242/dev.156117.
- Pascual, A., Hidalgo-Figueroa, M., Piruat, J. I., Pintado, C. O., Gómez-Díaz, R., and López-Barneo, J. (2008). Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat. Neurosci.* 11, 755–761. doi:10.1038/nn.2136.
- Pearson, S., Cuvertino, S., Fleury, M., Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2015). In vivo repopulating activity emerges at the onset of hematopoietic specification during embryonic stem cell differentiation. *Stem cell reports* 4, 431–444. doi:10.1016/j.stemcr.2015.01.003.
- Perez-Bouza, A., Di Santo, S., Seiler, S., Meyer, M., Anderreggen, L., Huber, A., et al. (2017a). Simultaneous Transplantation of Fetal Ventral Mesencephalic Tissue and Encapsulated Genetically Modified Cells Releasing GDNF in a Hemi-Parkinsonian Rat Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant.* 26, 1572–1581. doi:10.1177/0963689717721202.

- Perez-Bouza, A., Santo, S. Di, Seiler, S., Meyer, M., Anderegg, L., Huber, A., et al. (2017b). Simultaneous Transplantation of Fetal Ventral Mesencephalic Tissue and Encapsulated Genetically Modified Cells Releasing GDNF in a Hemi-Parkinsonian Rat Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant.* 26, 1572–1581. doi:10.1177/0963689717721202.
- Piccini, P., Brooks, D. J., Björklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Rimoldi, O., et al. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosci.* 2, 1137–1140. doi:10.1038/16060.
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., et al. (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 73–76. doi:10.1038/382073a0.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., et al. (2017). Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17013. doi:10.1038/nrdp.2017.13.
- Psiha, M., and Vlamos, P. (2015). Modeling neural circuits in Parkinson's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 822, 139–147. doi:10.1007/978-3-319-08927-0\_15.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., et al. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131, 2037–2048. doi:10.1242/dev.01107.
- Rajabzadeh, N., Fathi, E., and Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investig.* 6, 19. doi:10.21037/sci.2019.06.04.
- Rodríguez-Gómez, J. A., Lu, J.-Q., Velasco, I., Rivera, S., Zoghbi, S. S., Liow, J.-S., et al. (2007). Persistent Dopamine Functions of Neurons Derived from Embryonic Stem Cells in a Rodent Model of Parkinson Disease. *Stem Cells* 25, 918–928. doi:10.1634/stemcells.2006-0386.
- Roeper, J. (2013). Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 36, 336–342. doi:https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.03.003.
- Rossi, J., Tomac, A., Saarma, M., and Airaksinen, M. S. (2000). Distinct roles for GFR $\alpha$ 1 and GFR $\alpha$ 2 signalling in different cranial parasympathetic ganglia in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3944–3952. doi:https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00292.x.
- Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., and Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat. Med.* 12, 1259–1268. doi:10.1038/nm1495.
- Sanchez-Pernaute, R., Lee, H., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Yoshizaki, T., Sonntag, K. C., et al. (2008). Parthenogenetic dopamine neurons from primate embryonic stem cells restore function in experimental Parkinson's disease. *Brain* 131, 2127–2139. doi:10.1093/brain/awn144.

- Santosa, K. B., Jesuraj, N. J., Viader, A., MacEwan, M., Newton, P., Hunter, D. A., et al. (2013). Nerve allografts supplemented with schwann cells overexpressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Muscle Nerve* 47, 213–223. doi:10.1002/mus.23490.
- Sauer, H., Rosenblad, C., and Björklund, A. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8935–8939. doi:10.1073/pnas.92.19.8935.
- Shafa, M., Krawetz, R., Zhang, Y., Rattner, J. B., Godollei, A., Duff, H. J., et al. (2011). Impact of stirred suspension bioreactor culture on the differentiation of murine embryonic stem cells into cardiomyocytes. *BMC Cell Biol.* 12, 53. doi:10.1186/1471-2121-12-53.
- Shepherd, G. M. G. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 278–291. doi:10.1038/nrn3469.
- Shi, Q., Hodara, V., Simerly, C. R., Schatten, G. P., and VandeBerg, J. L. (2013). Ex vivo reconstitution of arterial endothelium by embryonic stem cell-derived endothelial progenitor cells in baboons. *Stem Cells Dev.* 22, 631–642. doi:10.1089/scd.2012.0313.
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., and Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 115–130. doi:10.1038/nrd.2016.245.
- Shim, J. H., Kim, S. E., Woo, D. H., Kim, S. K., Oh, C. H., McKay, R., et al. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 50, 1228–1238. doi:10.1007/s00125-007-0634-z.
- Sidorova, Y. A., and Saarma, M. (2016). Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their therapeutic potential. *Mol. Biol.* 50, 521–531. doi:10.1134/S0026893316040105.
- Simunovic, M., and Brivanlou, A. H. (2017). Embryoids, organoids and gastruloids: new approaches to understanding embryogenesis. *Development* 144, 976–985. doi:10.1242/dev.143529.
- Slevin, J. T., Gerhardt, G. A., Smith, C. D., Gash, D. M., Kryscio, R., and Young, B. (2005). Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line—derived neurotrophic factor. *J. Neurosurg.* 102, 216–222. doi:10.3171/jns.2005.102.2.0216.
- Song, J., Lee, S.-T., Kang, W., Park, J.-E., Chu, K., Lee, S., et al. (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neurosci. Lett.* 423, 58–61. doi:10.1016/j.neulet.2007.05.066.
- Soria, B., Roche, E., Berná, G., León-Quinto, T., Reig, J. A., and Martín, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in

- streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49, 157–162.  
doi:10.2337/diabetes.49.2.157.
- Soundararajan, P., Lindsey, B. W., Leopold, C., and Rafuse, V. F. (2007). Easy and rapid differentiation of embryonic stem cells into functional motoneurons using sonic hedgehog-producing cells. *Stem Cells* 25, 1697–1706. doi:10.1634/stemcells.2006-0654.
- Sriram, G., Tan, J. Y., Islam, I., Rufaihah, A. J., and Cao, T. (2015). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to arterial and venous endothelial cells under feeder- and serum-free conditions. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 261. doi:10.1186/s13287-015-0260-5.
- Stacy, M., Hickey, P., and Stacy, M. (2011). Available and emerging treatments for Parkinson's disease: a review. *Drug Des. Devel. Ther.* 5, 241–254.  
doi:10.2147/dddt.s11836.
- Stirparo, G. G., Boroviak, T., Guo, G., Nichols, J., Smith, A., and Bertone, P. (2018). Integrated analysis of single-cell embryo data yields a unified transcriptome signature for the human pre-implantation epiblast. *Development* 145, dev158501.  
doi:10.1242/dev.158501.
- Su, X., Kells, A. P., Huang, E. J., Lee, H. S., Hadaczek, P., Beyer, J., et al. (2009). Safety Evaluation of AAV2-GDNF Gene Transfer into the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway in Aged and Parkinsonian Rhesus Monkeys. *Hum. Gene Ther.* 20, 1627–1640.  
doi:10.1089/hum.2009.103.
- Sun, Y., Feng, L., Liang, L., Stacey, G. N., Wang, C., Wang, Y., et al. (2021). Neuronal cell-based medicines from pluripotent stem cells: Development, production, and preclinical assessment. *Stem Cells Transl. Med.* 10 Suppl 2, S31–S40.  
doi:10.1002/sctm.20-0522.
- Surmeier, D. J., Carrillo-Reid, L., and Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.051.
- T. Das, A., Tenenbaum, L., and Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr. Gene Ther.* 16, 156–167.  
doi:10.2174/1566523216666160524144041.
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., et al. (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115, 102–109. doi:10.1172/JCI21137.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse

- Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tan, T., Wu, J., Si, C., Dai, S., Zhang, Y., Sun, N., et al. (2021). Chimeric contribution of human extended pluripotent stem cells to monkey embryos *in vivo*. *Cell* 184, 2020–2032.e14. doi:10.1016/j.cell.2021.03.020.
- Tanik, S. A., Schultheiss, C. E., Volpicelli-Daley, L. A., Brunden, K. R., and Lee, V. M. Y. (2013). Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 288, 15194–15210. doi:10.1074/jbc.M113.457408.
- Tanner, C. M., Ross, G. W., Jewell, S. A., Hauser, R. A., Jankovic, J., Factor, S. A., et al. (2009). Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch. Neurol.* 66, 1106–1113. doi:10.1001/archneurol.2009.195.
- Tao, Y., and Zhang, S.-C. (2016). Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 19, 573–586. doi:10.1016/j.stem.2016.10.015.
- Taraviras, S., Marcos-Gutierrez, C. V., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., et al. (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development* 126, 2785–2797.
- Tenenbaum, L., and Humbert-Claude, M. (2017). Glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery in parkinson's disease: A delicate balance between neuroprotection, trophic effects, and unwanted compensatory mechanisms. *Front. Neuroanat.* 11, 1–12. doi:10.3389/fnana.2017.00029.
- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., et al. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199. doi:10.1038/nature05972.
- Theunissen, T. W., Powell, B. E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D. A., Reddy, J., et al. (2014). Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* 15, 471–487. doi:10.1016/j.stem.2014.07.002.
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-. ). 282, 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., et al. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7844–7848. doi:10.1073/pnas.92.17.7844.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., and Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11457–11462. doi:10.1073/pnas.1932826100.
- Treanor, J. J. S., Goodman, L., Sauvage, F. de, Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., et al.

- (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382, 80–83. doi:10.1038/382080a0.
- Trupp, M., Belluardo, N., Funakoshi, H., and Ibáñez, C. F. (1997). Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor- $\alpha$  indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J. Neurosci.* 17, 3554–3567. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-10-03554.1997.
- Turner, D. A., Baillie-Johnson, P., and Martinez Arias, A. (2016). Organoids and the genetically encoded self-assembly of embryonic stem cells. *BioEssays* 38, 181–191. doi:https://doi.org/10.1002/bies.201500111.
- Turner, L. (2021). ISSCR's Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: Supporting development of safe and efficacious stem cell-based interventions. *Stem Cell Reports* 16, 1394–1397. doi:10.1016/j.stemcr.2021.05.011.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110. doi:10.1016/0014-2999(68)90164-7.
- Ungerstedt, U., and Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24, 485–493. doi:10.1016/0006-8993(70)90187-3.
- van den Brink, S. C., Baillie-Johnson, P., Balayo, T., Hadjantonakis, A.-K., Nowotschin, S., Turner, D. A., et al. (2014). Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development* 141, 4231–4242. doi:10.1242/dev.113001.
- Vazey, E. M., Chen, K., Hughes, S. M., and Connor, B. (2006). Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 199, 384–396. doi:10.1016/j.expneurol.2006.01.034.
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R., et al. (2005). Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J. Neurosci.* 25, 4856–4867. doi:10.1523/JNEUROSCI.5158-04.2005.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035. doi:10.1038/nature08797.
- Voon, V., Mehta, A. R., and Hallett, M. (2011). Impulse control disorders in Parkinson's disease: recent advances. *Curr. Opin. Neurol.* 24, 324–330. doi:10.1097/WCO.0b013e3283489687.
- Wang, J., Carnicella, S., Ahmadiantehrani, S., He, D.-Y., Barak, S., Kharazia, V., et al. (2010). Nucleus accumbens-derived glial cell line-derived neurotrophic factor is a retrograde enhancer of dopaminergic tone in the mesocorticolimbic system. *J. Neurosci.* 30,

14502–14512. doi:10.1523/JNEUROSCI.3909-10.2010.

- Wang, J., Hu, W.-W., Jiang, Z., and Feng, M.-J. (2020a). Advances in treatment of neurodegenerative diseases: Perspectives for combination of stem cells with neurotrophic factors. *World J. Stem Cells* 12, 323–338. doi:10.4252/wjsc.v12.i5.323.
- Wang, M., Ling, K.-H., Tan, J. J., and Lu, C.-B. (2020b). Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells* 9. doi:10.3390/cells9061489.
- Wang, S., Wang, X., Tan, Z., Su, Y., Liu, J., Chang, M., et al. (2019). Human ESC-derived expandable hepatic organoids enable therapeutic liver repopulation and pathophysiological modeling of alcoholic liver injury. *Cell Res.* 29, 1009–1026. doi:10.1038/s41422-019-0242-8.
- Wever, I., Largo-Barrientos, P., Hoekstra, E. J., and Smidt, M. P. (2019). Lmx1b Influences Correct Post-mitotic Coding of Mesodiencephalic Dopaminergic Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 12. doi:10.3389/fnmol.2019.00062.
- Whone, A. L., Boca, M., Luz, M., Woolley, M., Mooney, L., Dharia, S., et al. (2019a). Extended Treatment with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* Preprint, 1–13. doi:10.3233/jpd-191576.
- Whone, A., Luz, M., Boca, M., Woolley, M., Mooney, L., Dharia, S., et al. (2019b). Randomized trial of intermittent intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Brain* 142, 512–525. doi:10.1093/brain/awz023.
- Widmer, H. R. (2018). Combination of cell transplantation and glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting encapsulated cells in Parkinson's disease. *Brain Circ.* 4, 114–117. doi:10.4103/bc.bc\_19\_18.
- Winslow, A. R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., et al. (2010).  $\alpha$ -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* 190, 1023–1037. doi:10.1083/jcb.201003122.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18, 173–179. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3.
- Wu, J., and Izpisua Belmonte, J. C. (2015). Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. *Cell Stem Cell* 17, 509–525. doi:10.1016/j.stem.2015.10.009.
- Wu, J., Platero-Luengo, A., Sakurai, M., Sugawara, A., Gil, M. A., Yamauchi, T., et al. (2017). Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* 168, 473–486.e15. doi:10.1016/j.cell.2016.12.036.
- Wyse, R. D., Dunbar, G. L., and Rossignol, J. (2014). Use of Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells to Treat Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 15. doi:10.3390/ijms15021719.



- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., et al. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92–96. doi:10.1038/35040568.
- Yang, F., Feng, L., Zheng, F., Johnson, S. W., Du, J., Shen, L., et al. (2001). GDNF acutely modulates excitability and A-type K(+) channels in midbrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1071–1078. doi:10.1038/nn734.
- Yang, X., Mertens, B., Lehtonen, E., Vercammen, L., Bockstael, O., Chtarto, A., et al. (2009). Reversible neurochemical changes mediated by delayed intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery in a partial Parkinson's disease rat model. *J. Gene Med.* 11, 899–912. doi:10.1002/jgm.1377.
- Yin, Y., Lim, Y. K., Salto-Tellez, M., Ng, S. C., Lin, C.-S., and Lim, S.-K. (2002). AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells* 20, 338–346. doi:10.1634/stemcells.20-4-338.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., et al. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519. doi:10.1038/nature06968.
- Yurek, D. M. (1998). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Improves Survival of Dopaminergic Neurons in Transplants of Fetal Ventral Mesencephalic Tissue. *Exp. Neurol.* 153, 195–202. doi:https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6884.
- Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.-B., Fötter, E., et al. (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 925–940. doi:10.1634/stemcells.22-6-925.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., et al. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* 19, 429–438. doi:10.1038/cr.2009.28.
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O., and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1129–1133. doi:10.1038/nbt1201-1129.
- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., and Ma, L. (2012). Embryonic stem cell markers. *Molecules* 17, 6196–6236. doi:10.3390/molecules17066196.
- Zhu, S., Zhao, C., Wu, Y., Yang, Q., Shao, A., Wang, T., et al. (2015). Identification of a Vav2-dependent mechanism for GDNF/Ret control of mesolimbic DAT trafficking. *Nat. Neurosci.* 18, 1084–1093. doi:10.1038/nn.4060.
- Zuo, T., Qin Yuxia, J., Chen, J., Shi, Z., Liu, M., Gao, X., et al. (2013). Involvement of N-cadherin in the protective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopaminergic neuron damage. *Int J Mol Med* 31, 561–568. doi:10.3892/ijmm.2013.1226.

Zurn, A. D., Widmer, H. R., and Aebischer, P. (2001). Sustained delivery of GDNF: towards a treatment for Parkinson's disease. *Brain Res. Rev.* 36, 222–229.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00098-4).