



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

GENERACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS HUMANAS PARA
LA EXPRESIÓN INDUCIBLE DE GFP MEDIANTE EL SISTEMA TetOn

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MELANIE TRINIDAD PERALTA

DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROSA NAVARRO GONZÁLEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
[Instituto de Química](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Febrero, 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio a cargo del Dr. Iván Velasco Velázquez en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular. Agradezco a él la tutoría y los consejos durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco también la orientación de mi comité tutor:

Dr. J. Iván Velasco Velázquez. Instituto de Fisiología Celular.

Dra. Rosa E. Navarro González. Instituto de Fisiología Celular.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo. Instituto de Química.

Agradezco a los integrantes del jurado de mi examen de grado.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante la maestría (CVU 1101967), así como al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) de la UNAM por el apoyo económico para la asistencia y participación en el IV Congreso Nacional de Neurobiología.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el financiamiento del proyecto (PAPIIT-UNAM IN213719, IN219122).

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas y su coordinación por la gestión y seguimiento del programa.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular bajo la responsabilidad de la Dra. Laura Ongay Larios, por sus servicios de síntesis y secuenciación de ácidos nucleicos.

Al apoyo experimental y enseñanza del Dr. Adolfo López Ornelas, así como el apoyo técnico de la Dra. Itzel Escobedo Ávila.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Juan y a Xóchitl por sus valiosísimos consejos y la orientación cuando los resultados no eran lo esperado. Realmente mil gracias.

A Margareht por el constante apoyo, académico y personal. Pero las risas no faltaron.

A los integrantes del laboratorio AL-101 (y de neuro) por tanto apoyo y hacer que el ambiente sea muy ameno.

A quienes me donaron/prestaron reactivos o material. ¿Qué sería de la ciencia mexicana sin los donativos entre estudiantes?

A quienes se tomaron el tiempo para aconsejarme en algún momento y para revisar mi trabajo.

A mi red de apoyo cercano. Muchas gracias, Ángel, por tu orientación y por las palabras de aliento cada vez que las necesitaba. Gracias a ti Mariana, por tus consejos y por las anécdotas que hicieron el trabajo mucho más llevadero. Gracias Luz, Fernando, Carmen y Cora por escucharme, por consolarme y por estar.

A mi mamá, por todo. Te agradezco tu amor incondicional y tu protección. A mi padre por sus enseñanzas, apoyo y lo que representa para mí. A Jafet por los consejos y las pláticas duras pero necesarias. A Dansito por ser mucha de mi motivación.

Y gracias a ti, Wendy. Has sido y eres mi sostén en tantos aspectos que considero que la mitad de este trabajo es tuyo. Estas pocas palabras realmente no alcanzan para expresarte mi gratitud. Muchas, muchas gracias, pequeña.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
FIGURAS Y TABLAS.	3
ABREVIATURAS.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Células troncales.....	6
1.1.1 Propiedades.	6
1.1.2 Tipos de células troncales.	6
1.1.3 Células troncales pluripotenciales.	8
1.2 Células troncales embrionarias humanas	14
1.2.1 Cultivo y caracterización de hESC.	14
1.2.2 Potenciales aplicaciones biomédicas.	16
1.3 Enfermedad de Parkinson.....	17
1.3.1 Fisiopatología.	18
1.3.2 Diagnóstico.....	19
1.3.3 Tratamientos para la enfermedad de Parkinson.....	20
1.3.4 Terapia por reemplazo celular.	21
1.4 Factor neurotrófico derivado de la línea glial.....	25
1.4.1 Señalización.	26
1.4.2 Uso del GDNF como tratamiento para la enfermedad de Parkinson... 27	
1.4.3 Regulación del sistema dopaminérgico por GDNF.....	29
1.5 Expresión inducible en hESC.....	30
1.5.1 Operón de resistencia a tetraciclina en <i>E. coli</i>	30
1.5.2 Sistema TetOn.....	30
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. HIPÓTESIS.	33
V. OBJETIVOS.....	33
a. General	33
b. Particulares	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	34
6.1 Expansión, purificación y análisis por restricción de plásmidos.	34

6.2	Construcción de los vectores TetO-GDNF y TRE-GDNF.....	35
6.3	Cultivo celular de hESC.	36
6.4	Curva de supervivencia por tratamiento con antibiótico.	36
6.5	Estandarización de la transfección de hESC-H9.....	36
6.6	Transfección de hESC-H9 por nucleofección.....	37
6.7	Selección por antibiótico y selección clonal	38
6.8	Inducción temporal de la expresión GFP simultánea a la selección.	39
6.9	Genotipificación de clonas transfectadas.	39
6.10	Transfección de pTetO-EGFP e inducción de la expresión de GFP por doxiciclina.	40
6.11	Evaluación del sistema TetOn para la expresión regulada de GFP.	41
VII.	RESULTADOS.	41
7.1	Estandarización de condiciones para la transfección de hESC-H9 y su selección por antibiótico.....	41
7.2	Integración del rtTA en hESC-H9 mediante CRISPR-Cas9.	46
7.3	Expresión temporal de GFP inducida por doxiciclina.	51
7.4	Transfección de TetO-EGFP y expresión de GFP inducible por doxiciclina. 53	
7.5	Evaluación del sistema TetOn para la expresión inducible y regulada de GFP. 56	
7.6	Construcción de los vectores TetO-GDNF y TRE-GDNF.....	60
VIII.	DISCUSIÓN.....	61
IX.	CONCLUSIONES.....	67
X.	PERSPECTIVAS.	68
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	68
	Anexos.	83

RESUMEN

Las células troncales embrionarias humanas (hESC) constituyen una fuente ilimitada de diversos tipos celulares clínicamente relevantes para las terapias por reemplazo celular, que buscan sustituir células dañadas o perdidas debido a enfermedades degenerativas. En el caso de la enfermedad de Parkinson (PD), una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (DaN), la disminución de dopamina en el estriado resulta en graves alteraciones motoras. El trasplante de DaN derivadas de hESC representa una alternativa prometedora al tratamiento farmacológico y ha demostrado mejorar los síntomas motores en modelos preclínicos, a pesar de una limitada supervivencia debido a un insuficiente soporte trófico. Se ha demostrado que el factor neurotrófico derivado de la línea glial (GDNF) promueve la supervivencia de las DaN *in vitro* e *in vivo* y su expresión constitutiva en ESC de ratón incrementa las DaN diferenciadas tras el trasplante en el estriado. No obstante, su sobreexpresión conduce a mecanismos compensatorios que reducen la función dopaminérgica de las neuronas, resaltando la necesidad de un control regulado de su expresión. En este contexto, se generaron clonas transgénicas de hESC-H9 que expresan GFP mediante el sistema de expresión inducible TetOn integrando el gen rtTA en el *locus* AAVS1 mediante el sistema CRISPR-Cas9. Tras la genotipificación de las clonas obtenidas, se transfectó el gen de GFP bajo el control del promotor inducible tetO. La inducción con 1 µg/ml de doxíciclina resultó en la expresión de GFP en el 34.9% de las células a las 12 horas, incrementándose al 48.5% a las 24 horas. La fluorescencia disminuyó significativamente después de 36 horas sin doxíciclina, aunque no se extinguió por completo. Estos resultados coinciden con lo esperado para el sistema TetOn, confirmando su funcionalidad en las hESC-H9. Posteriormente, este sistema podría ser utilizado para regular la expresión del GDNF y determinar su efecto en la supervivencia de las DaN derivadas de hESC.

ABSTRACT

Human embryonic stem cells (hESCs) constitute an unlimited source of various clinically relevant cell types for cell replacement therapies, which aim to replace cells damaged or lost due to degenerative diseases. In the case of Parkinson's disease (PD), a neurodegenerative disease characterized by the death of dopaminergic neurons (DaN), dopamine depletion in the striatum results in severe motor impairment. Transplantation of hESC-derived DaNs represents a promising alternative to pharmacological treatment and has been shown to improve motor symptoms in preclinical models, despite limited survival due to insufficient trophic support. Glial lineage-derived neurotrophic factor (GDNF) has been shown to promote DaN survival *in vitro* and *in vivo* and its constitutive expression in mouse ESCs increases differentiated DaN after transplantation into the striatum. However, its overexpression leads to compensatory mechanisms that reduce the dopaminergic function of neurons, highlighting the need for a regulated control of its expression. In this context, GFP-expressing hESC-H9 transgenic clones were generated using the TetOn inducible expression system by integrating the rtTA gene at the AAVS1 *locus* using the CRISPR-Cas9 system. After genotyping the obtained clones, the GFP gene was transfected under the control of the inducible promoter tetO. Induction with 1 µg/ml doxycycline resulted in GFP expression in 34.9% of cells at 12 hours, increasing to 48.5% at 24 hours. Fluorescence decreased significantly after 36 hours without doxycycline, although it was not completely extinguished. These results are in agreement with what was expected for the TetOn system, confirming its functionality in hESC-H9. Subsequently, this system could be used to regulate GDNF expression and determine its effect on the survival of hESC-derived DaN.

FIGURAS Y TABLAS.

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Potencialidad de células troncales.	7
2. Figura 2. Desarrollo temprano en mamíferos y morfogénesis del blastocisto. .	11
3. Figura 3. Las neuronas dopaminérgicas (DaN) pueden derivarse de distintas fuentes potenciales.	23
4. Figura 4. Sistema TetOn.....	31
5. Figura 5. Viabilidad de hESC-H9 a concentraciones crecientes de G418.....	44
6. Figura 6. Eficiencia de transfección en hESC-H9.....	45
7. Figura 7. Línea temporal para generar clonas hESC-H9-rtTA.....	46
8. Figura 8. Transfección de hESC-H9 para la integración del rtTA en el locus AAVS1 mediante el sistema CRISPR-Cas9.....	48
9. Figura 9. Identificación de clonas con la integración del rtTA en el locus AAVS1	51
10. Figura 10. Inducción transitoria de la expresión de GFP por doxíciclina.	52
11. Figura 11. Inducción de la expresión de GFP por doxíciclina en clonas seleccionadas.....	54
12. Figura 12. Inducción de la expresión de GFP luego de transfección del plásmido lineal o circular.	56
13. Figura 13. Evaluación del sistema TetOn en hESC-H9-rtTA.....	59
14. Figura 14. Seguimiento de la construcción de TetO-GDNF y TRE-GDNF.	61
15. Figura 15. Mapas de los plásmidos utilizados.	85
16. Figura 16. Secuenciación del amplificado NcoI-TetO GDNF-BsrGI.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados.....	34
Tabla 2. Condiciones de transfección mediante nucleofección.....	38
Tabla 3. Primers para la genotipificación de clonas.	40

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
DA	Dopamina
DaN	Neuronas dopaminérgicas
DAT	Transportador de dopamina
DBS	Estimulación cerebral profunda
Dox	Doxiciclina
EC	Células troncales de carcinoma embrionario
EHS	Sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm
EpiSC	Células troncales del epiblasto
ESC	Células troncales embrionarias
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
fVM	Tejido del mesencéfalo ventral fetal
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea glial
GFL	Familia de ligandos de GDNF
GFP	Proteína verde fluorescente
hESC	Células troncales embrionarias humanas
ICM	Masa celular interna
iPSC	Células troncales pluripotenciales inducidas
iROCK	Inhibidor de la proteína cinasa dependiente de Rho
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
mESC	Células troncales embrionarias de ratón
MSC	Células troncales mesenquimales
NHEJ	Unión por extremos no homólogos

ntESC	Células troncales embrionarias producidas por transferencia nuclear
NTF	Factor neurotrófico
PD	Enfermedad de Parkinson
PSC	Células troncales pluripotenciales
rtTA	Activador transcripcional reverso regulado por tetraciclina
SCNT	Transferencia nuclear de célula somática
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SSEA	Antígeno embrionario de estado específico
tetO	Operador Tet
TetR	Proteína represora Tet
TGF β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TGF β 3	Factor de crecimiento transformante beta 3
TH	Tirosina hidroxilasa
TRA	Antígeno de reconocimiento tumoral

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Células troncales.

1.1.1 Propiedades.

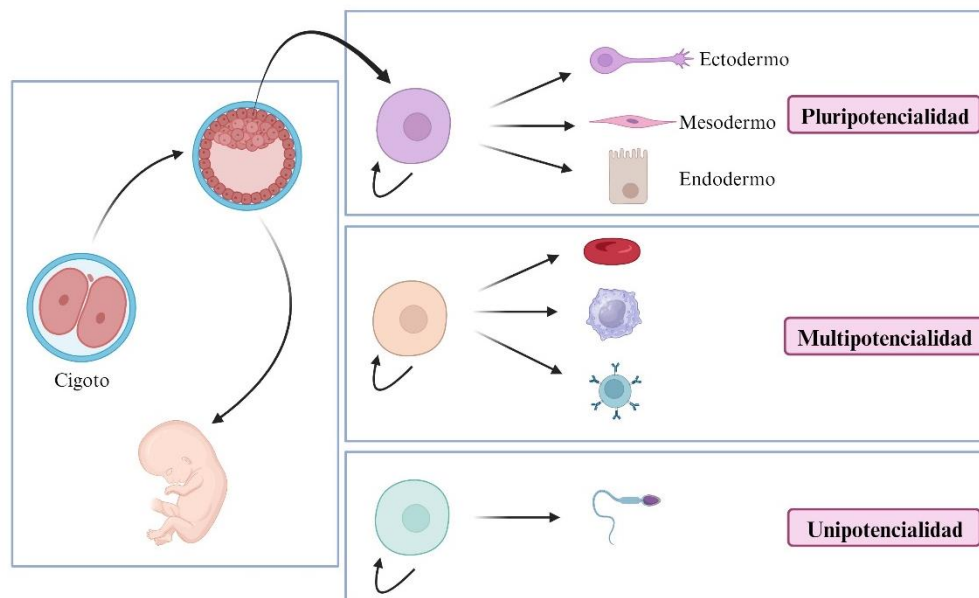
Las células troncales son células indiferenciadas caracterizadas por poseer dos propiedades fundamentales, su autorrenovación y su gran capacidad de diferenciación, también llamada potencialidad (Till & McCulloch, 1980; Weissman, 2000). La primera se refiere a que pueden producir réplicas de sí mismas en estado indiferenciado de manera ilimitada y la segunda a su competencia para especificarse a distintos linajes celulares especializados. Estas células aparecen durante el desarrollo embrionario de manera temporal, dado que ambas propiedades (autorrenovación y potencialidad) se restringen a medida que avanza el desarrollo. Es decir, las células de los primeros estadios poseen mayor potencialidad que las subsecuentes surgidas a partir de ellas.

Las células troncales pueden dividirse de forma simétrica o asimétrica, lo que mantiene sus propiedades (Morrison & Kimble, 2006). Al dividirse simétricamente, ambas células hijas pueden ser troncales o células destinadas a la diferenciación; lo que resulta en la expansión o la reducción, respectivamente, de la reserva de células troncales. En cambio, la división asimétrica da lugar a una célula troncal y una célula que continuará con su diferenciación. Ambos tipos de divisiones aseguran el mantenimiento de la población celular, por lo que representa una fuente de células ilimitada.

1.1.2 Tipos de células troncales.

Dependiendo de su potencialidad, las células troncales se dividen en pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (**figura 1**) (Gilbert & Barresi, 2016). Las células troncales pluripotenciales (PSC, del inglés *pluripotent stem cells*) son capaces de generar cualquier tipo celular del organismo, es decir, todas las células derivadas de alguna de las tres capas germinales en vertebrados; ectodermo, mesodermo y endodermo (aunque eso excluye a los tejidos extraembrionarios). Las PSC pueden aislarse a partir de distintas células presentes

durante el desarrollo temprano y todas ellas poseen la misma potencialidad, aunque no los mismos requerimientos para su crecimiento y diferenciación (Weinberger et al., 2016). Por otro lado, se considera que las células troncales multipotenciales son aquellas capaces de especificarse hacia los linajes celulares derivados de una capa germinal u órgano. Las células troncales hematopoyéticas son las células multipotenciales más estudiadas y se encargan del abastecimiento continuo de todas las células del sistema hematopoyético, que incluyen los linajes mieloide y linfóide (Till & McCulloch, 1980). Finalmente, las células troncales unipotenciales generan solamente células de un mismo linaje o tipo celular. Un ejemplo son las células troncales espermatozonales (también llamadas espermatozonias) residentes en el testículo de los mamíferos machos. Una vez que se alcanza la madurez sexual, las espermatozonias se diferencian hacia espermatozoides maduros continuamente y, al mismo tiempo, se mantiene la población troncal mediante su autorrenovación (Gilbert & Barresi, 2016).



1.Figura 1. Potencialidad de células troncales.

La potencialidad de una célula troncal se refiere a su capacidad de diferenciación. Las células troncales pluripotenciales (morado) se derivan de un cúmulo particular de células durante el desarrollo temprano y puede generar linajes de las tres capas germinales. Las células troncales multipotenciales (amarillo) se diferencian a linajes de una misma capa germinal. Las células troncales unipotenciales (azul) generan solamente células de un linaje. Imagen modificada de Marín-Llera & Chimal-Monroy, 2017.

1.1.3 Células troncales pluripotenciales.

Las células troncales pluripotenciales han sido objeto de gran interés dada su gran capacidad de diferenciación. En el embrión de mamíferos, las PSC se confinan a dos estructuras que se forman en las primeras etapas del desarrollo. Aunque ambas son transitorias (y una deriva de la otra), las PSC pueden aislarse del embrión en desarrollo y mantenerse en condiciones que propician su autorrenovación artificialmente. El estudio de los eventos celulares y moleculares relevantes durante el desarrollo temprano, descritos brevemente en la siguiente sección, permitió establecer las condiciones y requerimientos para el aislamiento de las PSC en cultivo *in vitro*.

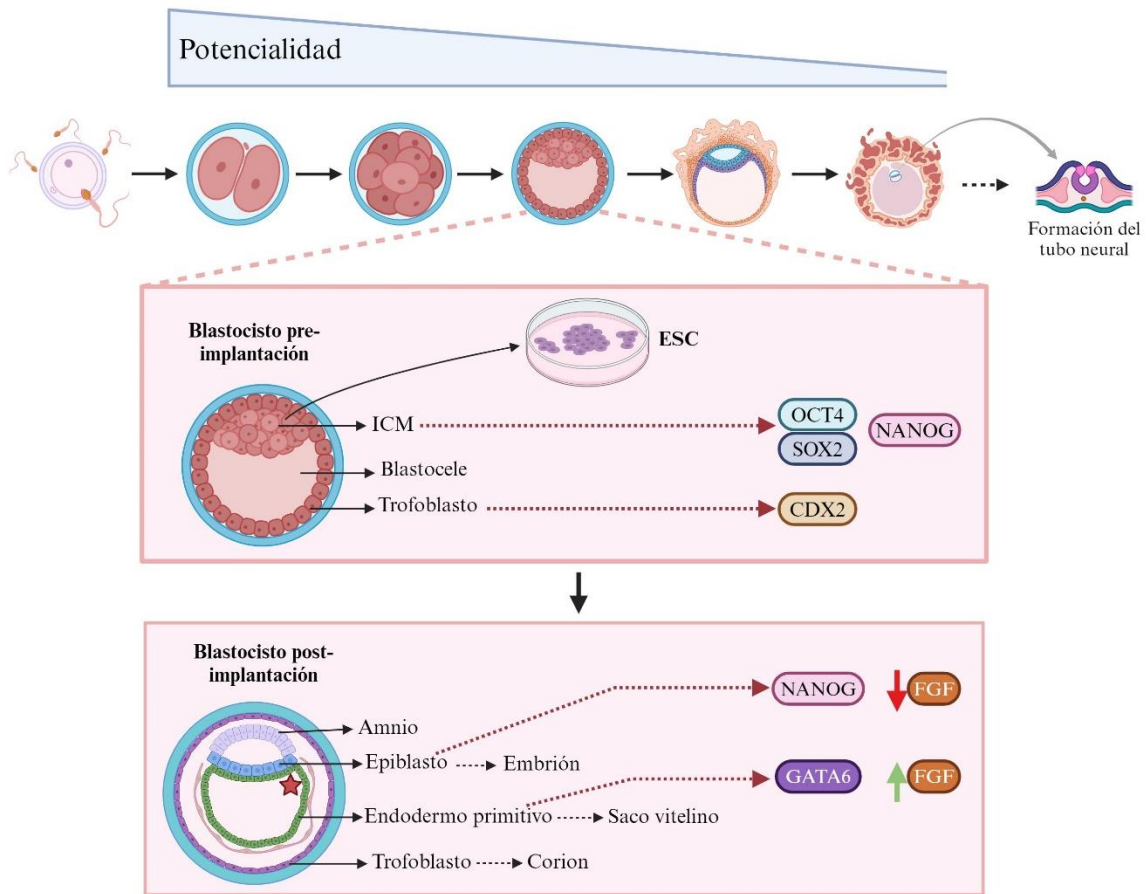
1.1.3.1 Desarrollo temprano de mamíferos.

El cigoto de los mamíferos comienza su desarrollo después de la fertilización, cuando sufre una serie de divisiones mitóticas de las que resultan células llamadas blastómeros y las cuales son morfológicamente indistinguibles en tamaño y forma. Después de las primeras divisiones se forma la mórula, un estado que abarca de las 8 a las 32 células y de las cuales emergen dos poblaciones distintas: una de células polares y otra de células apolares (Saini & Yamanaka, 2018). Las primeras poseen una polaridad apico-basal y toman una posición externa de manera que quedan expuestas al exterior y rodean al segundo grupo de células en el centro, las cuales son compactas y no polares (Johnson & Ziomek, 1981; Saini & Yamanaka, 2018). Las células del centro formarán después la masa celular interna (ICM, del inglés *inner cell mass*) y las del exterior el trofoblasto, de modo que la ICM queda yuxtapuesta al trofoblasto en un extremo. En el interior y opuesta a la ICM se forma el blastocelo, una cavidad que se llena de líquido por diversos procesos, como el bombeo de iones desde las células del trofoblasto (Wiley, 1984). Toda la estructura se conoce como blastocisto y es una etapa distintiva del desarrollo de los mamíferos (**figura 2, arriba**). Más adelante, las células de la ICM se segregan en dos linajes distinguibles: el epiblasto y el endodermo primitivo, también llamado hipoblasto. El epiblasto dará origen al embrión propiamente, incluidas las células germinales primordiales que son los precursores de las células germinales; mientras que el endodermo primitivo generará el saco vitelino (Rossant & Tam, 2022). Por su parte,

el trofoblasto formará eventualmente el trofotodermo y el corion. El trofotodermo se encarga de generar las células que se adhieren a la pared interna del útero en un evento conocido como implantación, y el corion es la porción embrionaria de la placenta que protegerá al embrión y le ayudará a recibir oxígeno y nutrientes de la madre (Gilbert & Barresi, 2016). Después del periodo de implantación continúan la gastrulación y la organogénesis, las cuales son fases críticas del desarrollo en las que establecen los ejes de simetría y se generan los precursores de los distintos tipos de tejido (Gilbert & Barresi, 2016; Nichols & Smith, 2012; Rossant & Tam, 2022).

La expresión diferencial de genes, principalmente factores de transcripción, juega un papel decisivo en la inducción y determinación de las células durante la especificación de los tejidos en el organismo. Los primeros blastómeros expresan OCT4, un factor transcripcional que es esencial para la pluripotencialidad y necesario para la formación de la ICM (Nichols et al., 1998). Después de que se forma el blastocisto, solamente las células del trofoblasto expresan CDX2, lo que conserva su identidad (Niakan & Eggan, 2013) y las de la ICM mantienen la expresión de OCT4 además de los factores de transcripción SOX2 y NANOG, preservando la pluripotencialidad. Dichos genes regulan su expresión mediante un bucle de retroalimentación positiva. Posteriormente, las células de la ICM expresan NANOG o GATA6 durante la especificación del epiblasto y del endodermo primitivo, respectivamente. La expresión de ambos genes es mutuamente excluyente y la segregación de las células depende de la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés). En el ratón, las células de la ICM que reciben la mayor señalización de Fgf4 son las que formarán el endodermo primitivo (Chazaud et al., 2006; Yamanaka et al., 2010). Después de la segregación de las estructuras embrionarias y extraembrionarias, la gastrulación inicia mediante la migración de células hacia la parte posterior del embrión donde se forma el nodo, que eventualmente generará el surco primitivo durante el establecimiento del futuro sistema nervioso. En este proceso, denominado neurulación, se induce el neuroectodermo, que forma el tubo neural a través de la regulación de los niveles de la proteína morfogenética del hueso (BMP, por sus siglas en inglés). La inhibición

de la señalización de BMP, regulado por antagonistas como Noggin, induce el destino neural del ectodermo y el cierre del tubo neural (Gilbert & Barresi, 2016). Posteriormente, el tubo se regionaliza formando los ejes anteroposterior y dorsoventral. La parte más anterior del tubo se segmenta en las tres vesículas primarias; prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Los factores transcripcionales Pax, así como el Fgf8 son cruciales en la determinación de los límites entre dichas regiones. La segmentación del rombencéfalo y la médula espinal (la parte más posterior del tubo neural) se regula por distintos genes que incluyen los Hox. Además, las vías señalización del FGF, Wnt y Ácido retinoico están implicadas en la caudalización del tejido neural (Altmann & Brivanlou, 2001). El patrón dorsoventral se regula mediante el gradiente de Sonic hedgehog (SHH) estableciendo la región ventral (conocida como placa de piso) y un gradiente de BMP4/BMP7 para la región dorsal (placa de techo). El patrón ventral es impuesto por la notocorda, localizada debajo del tubo, mientras que el patrón dorsal es inducido por la epidermis que está suprayacente al mismo (Gilbert & Barresi, 2016). Si bien en la etapa de epiblasto las capas germinales aún no están completamente separadas entre sí, después de la gastrulación las células que formarán el endodermo y el mesodermo del embrión se segregan a partir del surco primitivo; mientras que los precursores ectodérmicos se extienden lateralmente a éste (Gilbert & Barresi, 2016). En etapas posteriores, las células troncales restringen su potencialidad y se especifican gradualmente a medida que avanza el desarrollo.



2. **Figura 2.** Desarrollo temprano en mamíferos y morfogénesis del blastocisto.

Después de la fertilización, el cigoto se divide hasta formar el blastocisto. La masa celular interna (ICM) se forma en un extremo y mantiene la expresión de OCT4, SOX2 y NANOG. Las células troncales embrionarias (ESC) se derivan de la ICM. El trofoblasto, que expresa CDX2, rodea a la ICM y al blastocèle. Durante la implantación, se segregan las células de la ICM para formar el epiblasto y el endodermo primitivo gracias a la expresión diferencial de NANOG o GATA6, respectivamente. Asimismo, a mayor señalización de FGF, las células se especifican hacia endodermo primitivo. En la parte posterior del embrión se formará el nodo (estrella roja) que generará el surco primitivo y eventualmente el tubo neural para establecer el sistema nervioso central. A medida que avanza el desarrollo embrionario, la potencialidad de las células troncales disminuye.

1.1.3 Tipos de células troncales pluripotenciales.

En función de la célula de origen, existen múltiples tipos de células troncales pluripotenciales. Las primeras PSC identificadas fueron las células troncales de carcinoma embrionario (EC, del inglés *embryonal carcinoma*) derivadas de carcinomas o teratomas gonadales de ratón. Su potencialidad quedó demostrada después de observar la formación de un carcinoma completo después del trasplante de una sola célula EC en un hospedero y que, después, podía ser re-trasplantado (Kleinsmith & Pierce, 1964). La generación de teratomas todavía se usa como una prueba funcional de la pluripotencialidad de células troncales pluripotenciales, las cuales forman tumores luego de ser inyectadas subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos. Estos tumores contienen diferentes tipos de células somáticas provenientes de las tres capas germinales.

Otro ensayo funcional es la formación de quimeras, el cual representa el estándar de oro de las pruebas funcionales para evaluar la pluripotencialidad. Este ensayo consiste en la inyección de las células en la ICM de embriones de ratón para determinar si se integran en el organismo en crecimiento. La presencia de las PSC que han madurado hasta convertirse en células de la línea germinal demuestra que pueden transmitir su información genética a la siguiente generación.

El estudio de las EC y su relación con las células de etapa embrionaria derivó en el aislamiento de las células provenientes de la ICM del blastocisto de ratón, que se denominaron células troncales embrionarias (ESC, del inglés *embryonic stem cells*) (Andrews, 2002; M. J. Evans & Kaufman, 1981). Éstas se convirtieron en el modelo de estudio del desarrollo temprano ya que, a diferencia de las EC, no poseen alteraciones genéticas. Posteriormente, se establecieron PSC *in vitro* a partir de células germinales primordiales que, dado el origen y las características compartidas con células pluripotenciales, las llamaron células embrionarias germinales (Shamblott et al., 1998).

Más adelante, se descubrió que otra fuente de PSC era el epiblasto del embrión post-implantación, pero se observó que sus características de cultivo eran distintas

a las de ESC de ratón (mESC) (Brons et al., 2007a). Dichas células se denominaron células troncales del epiblasto o EpiSC. Se ha demostrado que las mESC residen en un estado de pluripotencialidad similar a la ICM denominado *naïve* y, en cambio, las EpiSC mantienen una configuración alternativa denominada pluripotencialidad *primed*. Existen marcadas diferencias moleculares y funcionales entre ellas, debido a su origen distinto. Por ejemplo, las ESC en estado *naïve* expresan los marcadores pluripotenciales Oct4, Nanog y Eer2, mientras que algunas moléculas, como el factor inhibidor de leucemia (LIF) y el FGF2, inducen vías de señalización que tienen efectos opuestos en ambos estados de potencialidad. Funcionalmente, las ESC inyectadas en la masa celular interna del blastocisto pre-implantación da lugar a la formación de ratones quiméricos, incluidas las células de la línea germinal (Weinberger et al., 2016). En cambio, las EpiSC mantienen la expresión de Oct4 y Sox2, pero reducen la de otros factores como Nanog, Eer2, Klf2 y Klf4. Debido a que las EpiSC corresponden a una fase de desarrollo más avanzada que el entorno del huésped, su inyección en la ICM del blastocisto no resulta eficaz para producir animales quiméricos (Hackett & Azim Surani, 2014; Weinberger et al., 2016).

Más recientemente, se consiguió el establecimiento de PSC a partir de células somáticas terminalmente diferenciadas, rompiendo con el paradigma de que el estado final de diferenciación es irreversible. La transferencia del núcleo de una célula adulta diferenciada a un ovocito enucleado lo conduce hacia un estado de troncalidad pluripotencial y permite generar ESC a partir de células somáticas de un paciente que podrían ser de utilidad para la terapia celular (Tachibana et al., 2013). Esta técnica se denomina transferencia nuclear de célula somática o SCNT y ha sido utilizada para obtener clones de organismos (genéticamente idénticos) como la oveja Dolly (Campbell et al., 1996). Usando otra estrategia, en 2006, investigadores japoneses consiguieron reprogramar fibroblastos embrionarios y adultos de ratón hacia PSC sin necesidad de un ovocito, mediante la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción esenciales para dicho estado; Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, excluyendo inesperadamente a Nanog (Takahashi & Yamanaka, 2006). Estas células se denominaron células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cells*) ya que conservan propiedades semejantes

a las ESC. Poco después, el mismo grupo de investigación generó iPSC a partir de fibroblastos adultos humanos (Takahashi et al., 2007).

1.2 Células troncales embrionarias humanas

La derivación de ESC de blastocistos de ratón (M. J. Evans & Kaufman, 1981) y, posteriormente, de primates no humanos (Thomson et al., 1995); permitió determinar las condiciones para cultivar células troncales pluripotenciales aisladas de embriones humanos. Si bien el ratón es el principal modelo del desarrollo en mamíferos, la duración del proceso y algunas estructuras tempranas difieren sustancialmente del embrión humano, por lo que el aislamiento de ESC humanas resultaba indispensable en el estudio del desarrollo y de enfermedades en tejidos específicos humanos. En 1998, se logró establecer líneas de células troncales embrionarias humanas (hESC, del inglés *human embryonic stem cells*) a partir de embriones tempranos productos de fertilización *in vitro* (Thomson et al., 1998). Al igual que las mESC, estas líneas celulares se derivan de la ICM, pueden dividirse en estado indiferenciado de manera ilimitada y presentan un cariotipo estable. Sin embargo, ambas difieren en su morfología y los factores de crecimiento requeridos para su cultivo.

1.2.1 Cultivo y caracterización de hESC.

En cultivo, las hESC forman colonias clonales y multicelulares caracterizadas por un borde bien definido. Las células individuales son compactas, es decir, pequeñas, redondas y sin espacio entre ellas, además de tener una relación núcleo-citoplasma elevada y nucleolos prominentes. Estas células expresan los marcadores de superficie antígeno embrionario de estado específico (SSEA, por sus siglas en inglés)-3, SSEA-4, así como el antígeno de reconocimiento tumoral (en inglés, TRA)-1-60 y TRA-1-81. Asimismo, presentan una expresión alta de fosfatasa alcalina. En contraste con las mESC, no expresan SSEA-1 en estado indiferenciado, pero sí después de haber sufrido una diferenciación (Thomson et al., 1998). Esta característica la comparten con células EC humanas y con ESC de primates no

humanos (Andrews, 2002; Thomson et al., 1995), pero no así con las EpiSC de ratón (Brons et al., 2007b).

Al inicio, las hESC se cultivaban sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) inactivados, que otorgaban soporte y permitían su crecimiento continuo en estado indiferenciado. No obstante, el uso de MEF implicaba la presencia de xenobióticos y patógenos animales, además de que aumentaba la variabilidad del cultivo y disminuía su reproducibilidad. Por ello, se desarrollaron sistemas de cultivo definidos reemplazando los MEF por componentes de la matriz extracelular como Laminina (Xu et al., 2001), Fibronectina (Amit et al., 2004), Vitronectina (Braam et al., 2008) o una combinación con Colágeno IV (Ludwig et al., 2006). Alternativamente, las hESC también se cultivaron sobre matrigel, el cual es un extracto de matriz extracelular y membrana basal compuesta principalmente de Colágeno IV, Laminina y Heparán sulfato proteoglicano. El matrigel fue aislado del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) murino (Kleinman et al., 1982; Xu et al., 2001) y favorece la proliferación de las hESC a largo plazo. El medio definido para las hESC elimina el uso de suero animal, reemplazándolo por un sustituto de suero e incorporando componentes definidos, como vitaminas, sales inorgánicas, lípidos específicos y factores de crecimiento recombinantes (Ludwig et al., 2006). Entre estos componentes destaca el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1) y Activina A, esenciales para mantener las células en un estado pluripotencial (Ludwig et al., 2006; Weinberger et al., 2016). Esta señalización se ve reforzada por FGF2 (o bFGF) que actúa como un factor de competencia para Activina, potenciando su efecto sobre la pluripotencialidad. Además, el mantenimiento de este estado en cultivos prolongados depende de dicha interacción entre FGF2 y la señalización de Activina (Vallier et al., 2005). Las hESC, así como las ESC de primates no humanos, se mantienen en estado indiferenciado en ausencia de LIF y presentan altos niveles de actividad de la telomerasa (Thomson et al., 1995, 1998), el complejo de ribonucleoproteína que se encarga de elongar los telómeros de los cromosomas en cada ciclo de replicación, lo que reduce su acortamiento y, de esta manera, se evade la senescencia celular.

Como en otros tipos de PSC, el estado de pluripotencialidad a nivel molecular se mantiene por la expresión de los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG (Boyer et al., 2005), que se autorregulan mediante retroalimentación positiva. Se ha visto que el estado pluripotencial de las hESC es similar al de las EpiSC de ratón, dado que muestran características del estado *primed* como un genoma más metilado y la inactivación del cromosoma X en las líneas femeninas (Weinberger et al., 2016). De manera funcional, la caracterización de las hESC se realiza mediante el ensayo de formación de teratomas en ratones inmunosuprimidos, en los que se demuestra su diferenciación a células somáticas provenientes de las tres capas germinales (Thomson et al., 1998). Sin embargo, su contribución a la línea germinal en quimeras (ratón-hESC) no puede ser evaluada *in vivo* por evidentes razones éticas.

1.2.2 Potenciales aplicaciones biomédicas.

Las hESC no sólo representaron un sistema más fidedigno para estudiar el desarrollo y la diferenciación de tejidos humanos, sino que también se les atribuyó una prometedora aplicación para reparar tejidos y órganos dañados al sustituirlos por células sanas y funcionales. De esta manera, se dio un impulso a la medicina regenerativa y la terapia celular (Hoang et al., 2022; Thomson et al., 1998). Esta última se refiere a la transferencia de células de manera alogénica (entre individuos de la misma especie) o autóloga (con células propias) a un paciente con fines terapéuticos (El-Kadiry et al., 2021). Actualmente, las terapias celulares más importantes incluyen células troncales sanguíneas movilizadas y células troncales mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cells*), las cuales pueden obtenerse fácilmente de pacientes o donantes para su uso en trasplantes (Trounson & DeWitt, 2016). Sin embargo, estas células tienen un potencial limitado en comparación con las PSC, dado que su capacidad de diferenciación corresponde a la multipotencialidad, resaltando así la gran potencialidad de las hESC y de las iPSC.

1.2.3 Terapia por reemplazo celular.

La terapia por reemplazo celular pretende sustituir las células que han perdido su función como consecuencia de un daño tisular o una enfermedad degenerativa. Dadas sus características, las hESC se han utilizado como una fuente ilimitada de precursores o de células diferenciadas en linajes específicos clínicamente relevantes. Hasta la fecha, los primeros ensayos clínicos de fase I y II están en proceso de evaluar la seguridad y eficiencia de células derivadas de PSC en cinco áreas principales: la lesión medular, la degeneración macular, la diabetes tipo I, las cardiopatías y las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (Eguizabal et al., 2019; Trounson & DeWitt, 2016).

1.3 Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (PD, del inglés *Parkinson's disease*) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, después de la enfermedad de Alzheimer. Se caracteriza por un conjunto de movimientos anormales progresivos, referidos como síntomas motores, que se agravan con el tiempo y afectan la calidad de vida de los pacientes (Bloem et al., 2021). La incidencia de la PD aumenta con la edad, dado que es más frecuente entre la población mayor de 65 años, sin embargo, también puede afectar a personas menores incluso de 50 años. Tanto la incidencia como la prevalencia son mayores en hombres que en mujeres y, además, la edad de inicio de la enfermedad es mayor en mujeres (Ou et al., 2021; Ray Dorsey et al., 2018). Hasta 2019, la incidencia se elevó de manera global respecto a las dos décadas pasadas, lo que pudiera estar relacionado con el incremento de la población en edad avanzada, los cambios en el estilo de vida y la contaminación (Ou et al., 2021). Varias observaciones sugieren que la PD en realidad no es una entidad única, sino que puede manifestarse con síntomas y patrones de progresión muy variables que dan lugar a un síndrome denominado “parkinsonismo” (Bloem et al., 2021). Esta hipótesis se refuerza por el

número y la diversidad de los factores que pueden desencadenar la enfermedad, así como la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas.

Dependiendo de su etiología, la PD puede clasificarse en las variantes genética y esporádica. Se sugiere que la variación genética contribuye al riesgo total de desarrollar la enfermedad e incluso se han identificado variantes de genes únicos que son suficientes para causar PD, es decir, son patogénicos, aunque muy poco frecuentes (Day & Mullin, 2021). Actualmente, los genes más estudiados que se asocian a la PD son *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1* y *GBA* (Bloem et al., 2021). Las mutaciones en el gen *SCNA*, por ejemplo, se relacionan con una aparición más temprana de la enfermedad, una progresión más rápida de los síntomas motores y la presencia de otros signos como un deterioro cognitivo acelerado (Bloem et al., 2021; Day & Mullin, 2021). Por su parte, los genes *PRKN* y *PINK1* regulan la función mitocondrial y se asocian con una progresión lenta de la enfermedad (Day & Mullin, 2021).

No obstante, el 90% de los casos de PD no tienen una causa genética identificable, es decir, son esporádicos (Bloem et al., 2021). Sin duda, el principal factor de riesgo para el desarrollo de la PD es la edad, pero, además, se ha reportado que los factores conductuales y ambientales desempeñan un papel clave en la patogénesis y progresión de la enfermedad. Entre ellos, se encuentran la exposición a pesticidas, el consumo de productos lácteos, los antecedentes de melanoma y las lesiones cerebrales traumáticas (Ascherio & Schwarzschild, 2016).

1.3.1 Fisiopatología.

La enfermedad de Parkinson se identifica por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (DaN) residentes en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) derivadas del mesencéfalo ventral, cuyos axones se proyectan hacia el estriado constituyendo una inervación conocida como la vía nigroestriatal y es causa principal del fenotipo motor anormal de los pacientes con PD. Esta vía es uno de los principales componentes de los ganglios basales, las estructuras cerebrales interconectadas que intervienen en el control motor (Harris et al., 2020). La pérdida

de alrededor del 60% de las DaN en la SNpc conduce a la reducción de dopamina (DA) en el estriado afectando el sistema motor (Dauer & Przedborski, 2003). La PD se manifiesta mediante cuatro principales síntomas motores; temblor en reposo; rigidez muscular o resistencia al movimiento; bradicinesia, que se refiere a la ralentización de los movimientos espontáneos y automáticos, e inestabilidad en la postura (National Institute of Neurological Disorder and Stroke, 2019). No obstante, los pacientes también presentan una gran variedad de síntomas no motores que van desde alteraciones del sueño, alteraciones visuales y pérdida del olfato, hasta deterioro cognitivo y trastornos neuropsiquiátricos (Ehgoetz Martens & Shine, 2018).

Otra característica patológica relevante es la presencia de agregados de proteínas α -Sinucleína y Ubiquitina en el citoplasma celular conocidos como cuerpos de Lewy, los cuales interfieren con el funcionamiento correcto de las neuronas alterando mecanismos como el tráfico vesicular y el sistema de degradación proteica ubiquitina-proteosoma (Dauer & Przedborski, 2003; Harris et al., 2020). Asimismo, se ha sugerido que las DaN de la SNpc podrían ser propensas a la acumulación de mutaciones mitocondriales durante el envejecimiento y que los pacientes con PD presentan mitocondrias disfuncionales con baja actividad del complejo 1 (Dauer & Przedborski, 2003; Sulzer, 2007).

1.3.2 Diagnóstico.

Los criterios para el diagnóstico de la PD se basan en las características clínicas y la exploración neurológica. Dado que aún no existe una prueba objetiva fiable para su diagnóstico, la opinión de los expertos sigue siendo un estándar de oro. Para el diagnóstico correcto, primero se debe definir la existencia de parkinsonismo, lo que requiere la presencia de bradicinesia, en combinación con temblor en reposo, rigidez o ambos. El segundo paso consiste en distinguir la enfermedad de Parkinson de otras causas de parkinsonismo, lo cual es importante dado que dichas causas incluyen afecciones neurodegenerativas denominadas en conjunto “parkinsonismo atípico” y que suelen tener un pronóstico mucho menos favorable (Bloem et al., 2021; Postuma et al., 2016).

Sin embargo, debido a la heterogeneidad de los signos y la presencia de comorbilidades, hasta el 15% de las personas son diagnosticadas de manera incorrecta (Bloem et al., 2021). En los casos de Parkinson familiar (genético) se pueden realizar pruebas genéticas. No obstante, el diagnóstico definitivo sólo puede establecerse a partir de la identificación *post mortem* de cambios neuropatológicos característicos en el cerebro, como la presencia de los cuerpos de Lewy.

1.3.3 Tratamientos para la enfermedad de Parkinson.

Actualmente, los tratamientos más frecuentes para la PD son farmacológicos y buscan reponer el suministro de dopamina en el estriado. El fármaco más utilizado es levodopa o dihidroxifenilalanina (L-DOPA), el cual es un precursor de la DA que atraviesa la barrera hematoencefálica y que, desde su desarrollo, ha mostrado gran eficacia para disminuir los síntomas motores (Yahr et al., 1969). Sin embargo, su administración crónica y de dosis altas se asocia con la aparición de fluctuaciones motoras y discinesias, es decir, movimientos involuntarios de torsión excesivos (Olanow & Stocchi, 2018). También se han utilizado agonistas de dopamina como pramipexol y ropinirol. Estos fármacos son agonistas del receptor de dopamina tipo D2, los cuales reducen los síntomas motores y producen menos efectos secundarios en comparación con levodopa, sin embargo, sólo son eficaces en etapas tempranas de la PD (Baker et al., 2009). Otros fármacos administrados son los inhibidores de la enzima Oxidasa de monoamina (MAO), que se encarga de metabolizar la dopamina, por lo que se reduce su degradación. Estos fármacos tienen gran eficacia en etapas tempranas de la enfermedad y también se recomiendan como adyuvantes de levodopa en pacientes con discinesias y fluctuaciones motoras (Tan et al., 2022).

A inicios de 1990, se reportó que la talamotomía con estimulación eléctrica de alta frecuencia mejoraba significativamente todas las complicaciones motoras (Laitinen et al., 1992), lo que condujo a la estimulación cerebral profunda (DBS, del inglés *deep brain stimulation*) como un tratamiento eficaz para la PD. La DBS consiste en la aplicación de impulsos eléctricos en áreas específicas del cerebro como el globo

pálido interno y el núcleo subtalámico, las cuales son objetivos eficaces y seguros, con la intención de controlar las complicaciones motoras inducidos por L-DOPA (Groiss et al., 2009). A menudo, los fármacos son el primer paso del tratamiento, seguido de la DBS como segunda opción, ya que sólo es recomendado para desórdenes motores severos (Harris et al., 2020). En algunos casos, los pacientes sometidos a DBS continúan con levodopa a menores dosis.

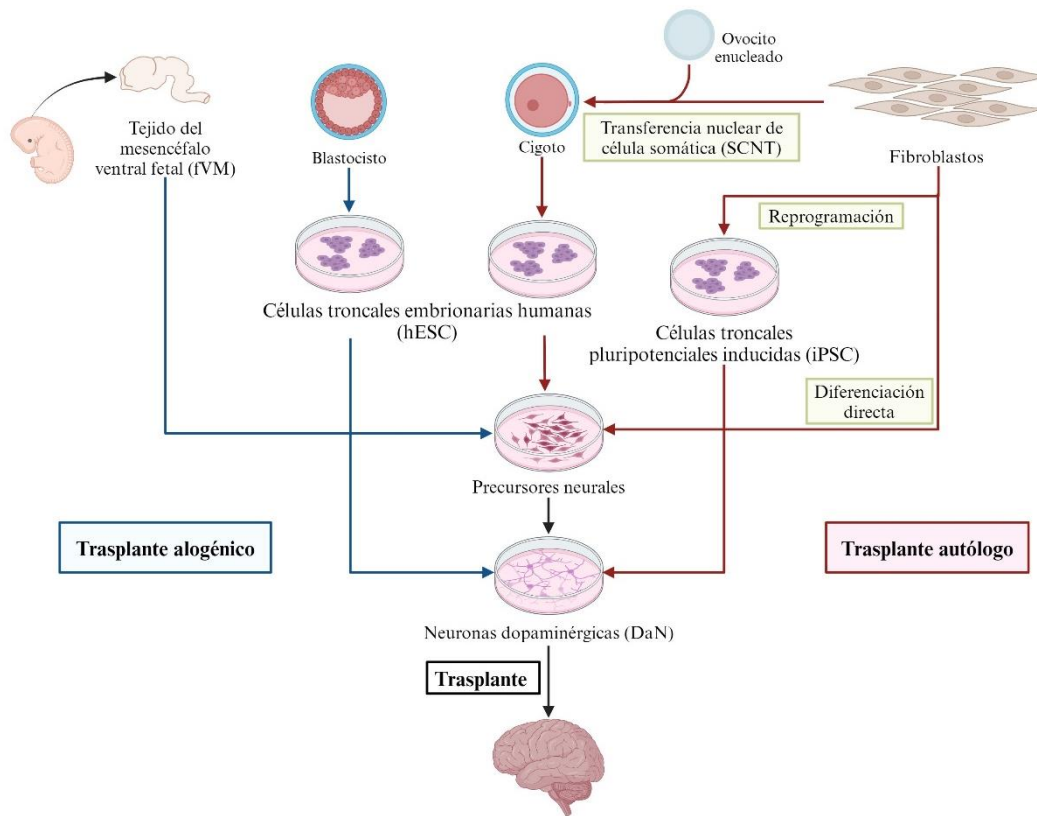
Si bien estos tratamientos mejoran los síntomas motores, no frenan la neurodegeneración y, además, pierden su efecto con el tiempo. La falta de eficiencia a largo plazo se asocia frecuentemente a la aparición de efectos secundarios (como las discinesias) y a la muerte progresiva de las DaN, que disminuyen los beneficios clínicos (Harris et al., 2020).

1.3.4 Terapia por reemplazo celular.

La terapia por reemplazo celular ha surgido como una alternativa y pretende restaurar la vía nigroestriatal mediante el trasplante de neuronas dopaminérgicas provenientes de distintas fuentes no sólo para disminuir los síntomas motores de la PD, sino también para detener su progresión (Katolikova et al., 2020). La primera fuente de DaN fue el tejido del mesencéfalo ventral de fetos abortados (fVM), cuyo trasplante a pacientes con PD contribuyó a mejorar los síntomas motores y, además, se demostró su supervivencia a largo plazo (Lindvall et al., 1990). No obstante, en ensayos clínicos posteriores con la misma aproximación, no se logró una mejora significativa y, por el contrario, algunos pacientes desarrollaron una discinesia particular denominada discinesia inducida por el injerto (Katolikova et al., 2020; Sonntag et al., 2018a). Dichos resultados se han atribuido a la variabilidad de los parámetros clínicos utilizados y la falta de estandarización del protocolo (Sonntag et al., 2018a). Como consecuencia, el interés en el desarrollo de terapias basadas en el trasplante disminuyó. Además, el trasplante de fVM involucraba dos principales limitantes: el número reducido de neuronas que se obtienen y la escasez del tejido fetal; por lo que una fuente de células ilimitada como la PSC mostraron una aproximación prometedora.

Las neuronas dopaminérgicas pueden derivarse de otras fuentes como la expansión y diferenciación de precursores neurales, la reprogramación neuronal directa de células somáticas hacia DaN, la generación de PSC humanas mediante SCNT y la diferenciación dirigida a partir de iPSC (**figura 3**) (Revisado en Sonntag et al., 2018). Se ha demostrado, por ejemplo, que las EpiSC producen DaN con una capacidad funcional similar a los progenitores derivados de fVM (Precious et al., 2020). Asimismo, se ha reportado el éxito de la generación de DaN a partir de ESC producidos por SCNT (denominados ntESC), partiendo de fibroblastos de un modelo animal de la PD (Amano et al., 2009). Sin embargo, este método presenta una eficiencia muy baja y fenotipos anormales derivados de la reprogramación nuclear incompleta (Loi et al., 2016). Las DaN derivadas de ntESC, así como la diferenciación dirigida a partir de iPSC representan la solución a los principales inconvenientes asociados al uso de fMV o de hESC como el rechazo inmunológico del trasplante y la inmunosupresión, además de los problemas prácticos del suministro y la disponibilidad (Sonntag et al., 2018a).

Hasta la fecha, se han realizado un gran número de estudios para la evaluación de las DaN derivadas de PSC humanas, incluyendo hESC, MSC e iPSC en modelos pre-clínicos de la PD, así como en ensayos clínicos con pacientes, los cuales han mostrado en su mayoría resultados positivos (Revisado en Hoang et al., 2022; Katolikova et al., 2020).



3. **Figura 3.** Las neuronas dopaminérgicas (DaN) pueden derivarse de distintas fuentes potenciales.

El tejido del mesencéfalo ventral fetal (fVM) fue la primera fuente de DaN para su trasplante en pacientes con PD, el cual era alogénico y requería un régimen de inmunosupresión. Las células troncales embrionarias humanas (hESC) pueden provenir de la ICM del blastocisto o mediante transferencia nuclear de célula somática (SCNT) a partir de fibroblastos. Luego, las hESC pueden someterse a una diferenciación in vitro para generar DaN o precusores neurales. La ventaja de la SCNT es que las DaN derivan de fibroblastos provenientes del propio paciente, por lo que no existen rechazo inmunológico. Otros métodos que no requieren inmunosupresión son la reprogramación de fibroblastos hacia células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC) y la diferenciación directa hacia DaN o precusores neurales. Se indican los procedimientos para un trasplante alogénico o autólogo en flechas azules y rojas respectivamente. Imagen modificada de Sonntag et al., 2018a.

1.3.5 Trasplante de neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir de hESC.

Con el objetivo de producir neuronas dopaminérgicas para la terapia por reemplazo celular, se han reportado protocolos de diferenciación específica de hESC hacia DaN del mesencéfalo ventral basados en distintas estrategias como el cocultivo con células estromales (Zeng et al., 2004), la formación de cuerpos embrioides (Ma et al., 2011) y la señalización de moléculas pequeñas en un medio definido (Kirkeby

et al., 2012; Kriks et al., 2011). Particularmente, esta última es una aproximación eficiente y directa en la que las hESC se someten a una inhibición dual de las proteínas SMAD interrumpiendo la señalización de Nodal y Activina con el objetivo de promover la diferenciación neural para después estimular la señalización de SHH, WNT y FGF8 e inducir así la identidad de placa de piso mesencefálica, que representa la población celular de origen de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Finalmente, se promueve la diferenciación y maduración de los precursores neurales con moléculas como ácido ascórbico, dibutilil AMP cíclico, DAPT (inhibidor de la vía de Notch) y TGF β 3, así como con factores que favorecen la supervivencia. De esta manera, al día 25 de diferenciación se obtienen células con identidad de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral dada la coexpresión de marcadores como LMX1A, FOXA2, PITX3, NURR1 y tirosina hidroxilasa (TH) (Kriks et al., 2011), la enzima encargada de catalizar la conversión de L-tirosina a L-DOPA, que es el precursor inmediato de la dopamina. Si bien la expresión de estas proteínas no es exclusiva de las DaN, el conjunto de ellas describe su identidad.

Las DaN derivadas de hESC son trasplantadas a menudo en el hemisferio lesionado del cerebro en modelos animales de la PD. Uno de los modelos neurotóxicos ampliamente usado es la lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), un análogo de la dopamina altamente oxidable que causa efectos citotóxicos en las DaN como la producción de radicales libres, lo que conduce a una neurodegeneración rápida y severa (Dovonou et al., 2023). Estos modelos experimentales se denominan modelos murinos hemiparkinsonianos. Se ha demostrado que las DaN diferenciadas de hESC y trasplantadas en el estriado (Grealish et al., 2014; Kriks et al., 2011; Piao et al., 2021) o en el mesencéfalo ventral (Adler et al., 2019; Cardoso et al., 2018) de roedores lesionados son capaces de mejorar o revertir los síntomas motores de los animales. Dicho efecto también se ha observado en primates no humanos (López-Ornelas et al., 2023; Y. K. Wang et al., 2018).

Por otra parte, las neuronas derivadas de ESC que son trasplantadas deben madurar, integrarse y funcionar tras el trasplante *in vivo*. Para ello, es necesario

comprender mejor la capacidad de inervación de las células trasplantadas, así como las del huésped, con el objetivo de restablecer una conectividad similar a la de los circuitos endógenos sanos. Se ha reportado que las DaN derivadas de hESC son capaces de integrarse ampliamente en los circuitos del huésped y desarrollar proyecciones axonales hacia la parte dorsolateral del estriado a partir de las 18 semanas del trasplante intranigral, lo que coincide con la recuperación motora de los animales (Cardoso et al., 2018).

1.3.6 Supervivencia de las neuronas dopaminérgicas trasplantadas.

Si bien el trasplante de DaN diferenciadas ha mostrado tener eficacia en la recuperación de modelos animales de la PD, se ha visto que la función de las DaN trasplantadas a ratas de edad avanzada se ve reducida debido al pobre soporte trófico del cerebro (Collier et al., 1999). Asimismo, es importante considerar el rechazo inmunológico del trasplante por parte del hospedero, ya que se ha mostrado mayor supervivencia de DaN derivadas de PSC luego de un trasplante autólogo en comparación con las neuronas generadas a partir PSC alogénicas (Morizane et al., 2013). Por ello, se ha planteado el uso de moléculas que asistan a la integración y supervivencia de las neuronas trasplantadas, como los factores neurotróficos (NTF, por sus siglas en inglés) y las neurotrofinas (di Santo & Widmer, 2018). Estas moléculas son los mejores candidatos para estimular la supervivencia y maduración de las neuronas, por lo que han sido utilizados ampliamente en las últimas etapas de los protocolos de diferenciación dopaminérgica (Revisado en M. Wang et al., 2020).

1.4 Factor neurotrófico derivado de la línea glial.

El factor neurotrófico derivado de la línea glial (GDNF, del inglés *glial cell line-derived neurotrophic factor*) es un factor neurotrófico perteneciente a la familia de ligandos de GDNF (GLF). Esta familia incluye también a las moléculas Neurturina, Artemina y Persefina, todos ellos miembros de la superfamilia de TGF β . Inicialmente, se caracterizó al GDNF como un potente factor de supervivencia de

las DaN, demostrado por el aumento de este tipo neuronal en cultivos primarios de mesencéfalo tratados con GDNF (Lin et al., 1993). Posteriormente, se observó que el GDNF también ejercía un efecto neurotrófico sobre DaN *in vivo* (Tomic et al., 1995). En reportes ulteriores, se demostró que tiene efecto sobre diversos procesos como la proliferación y la especificación al fenotipo dopaminérgico, el crecimiento axonal, como molécula quimiotrópica y también en la maduración sináptica y electrofisiológica (Cortés et al., 2017; Ibáñez & Andressoo, 2017; Saavedra et al., 2008). Durante el desarrollo, el GDNF parece ejercer otras funciones además de la supervivencia de neuronas, ya que comienza su expresión antes de la aparición de neuronas postmitóticas y se extiende a regiones extra-neurales. Participa, por ejemplo, en el desarrollo del sistema nervioso entérico (ENS, por sus siglas en inglés) y en el de los riñones (Cortés et al., 2017). En la morfogénesis del ENS, el GDNF promueve la división celular, dirige la migración de las células hacia el mesoderma intestinal e induce la diferenciación neuronal (Mwizerwa et al., 2011). Si el GDNF o su receptor son deficientes en ratones o humanos, la cría o niño sufre la enfermedad de Hirschsprung, un síndrome en el que el intestino no puede evacuar correctamente los desechos sólidos debido a su incapacidad de realizar peristaltismo. Los ratones *knockout* homocigotos para el gen de GDNF presentan defectos en el desarrollo renal y muerte neonatal (M. W. Moore et al., 1996).

1.4.1 Señalización.

El GDNF se secreta como un precursor que se activa por un corte proteolítico y presenta actividad únicamente como dímero. Como toda la familia de GFL, señala a través del receptor RET, aunque se requiere la unión al receptor de la familia de GDNF- α o GFR α , previo a la activación de RET (Airaksinen & Saarma, 2002). El complejo GDNF-GFR α se une al receptor RET que tiene un dominio intracelular de Cinasa de tirosina, el cual se autofosforila durante su activación. Río abajo, se estimulan 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, así como la vía PI3K/AKT que induce la

supervivencia, diferenciación, crecimiento y formación de neuritas en las DaN (Airaksinen & Saarma, 2002; Conway et al., 2020; Kramer & Liss, 2015; Sariola & Saarma, 2003). Además, se ha demostrado que el GDNF también regula la expresión del Transportador de dopamina (DAT, por sus siglas en inglés) mediante la interacción GDNF-GFR- α -RET, promoviendo la expresión de factor de intercambio del nucleótido de guanina Vav2 (Zhu et al., 2015).

1.4.2 Uso del GDNF como tratamiento para la enfermedad de Parkinson.

Debido a su importante papel neuroprotector, el GDNF se ha administrado en modelos animales de la PD, en los que potencia la función del sistema dopaminérgico y la supervivencia de DaN del mesencéfalo (Ibáñez & Andressoo, 2017). Su suministro, sin embargo, presenta complicaciones debido a que no atraviesa la barrera hematoencefálica. Se ha llevado a cabo su administración mediante una inyección intraventricular o de manera directa en el estriado. En modelos animales de la PD, se demostró que el GDNF protege a las neuronas contra la degeneración por 6-OHDA y es capaz de inducir una recuperación tanto celular como funcional (J. R. Evans & Barker, 2008). Por ello, también se ha evaluado en ensayos clínicos en pacientes con PD. En un primer acercamiento, se suministró el GDNF mediante un catéter intracerebroventricular en una cohorte de 50 pacientes con PD, sin embargo, no mostraron ningún efecto clínico positivo tal vez debido a que este NTF no alcanzó el estriado, su tejido blanco (Nutt et al., 2003). Posteriormente, se evaluó la administración del GDNF con un catéter intraparenquimal, por el que se realizaban infusiones. En este estudio, los pacientes mostraron una mejoría de los síntomas motores y reducción de las discinesias. No obstante, las infusiones debían incrementarse al doble después de 18 meses (Gill et al., 2003). Cabe mencionar que este estudio incluyó solamente a cinco pacientes y no fue posible determinar el efecto placebo.

Debido a las inconsistencias en los resultados de estos ensayos, se realizaron otros con mayor rigurosidad, siendo aleatorios y de doble ciego. Los resultados mostraron que no había ninguna diferencia significativa entre los pacientes tratados con GDNF

o con el placebo (Lang et al., 2006). Aún no son claras las razones de estos resultados, pero es evidente la necesidad de identificar la naturaleza de las diferencias en la respuesta terapéutica.

Por ello, han surgido otros métodos para la liberación del GDNF en el cerebro, como su expresión empleando un vector lentiviral. Mediante esta estrategia, se ha mostrado que el trasplante de DaN derivadas de hESC directamente en un entorno rico en GDNF promueve su supervivencia, mientras que la exposición tardía del injerto al factor neurotrófico aumenta su maduración y función dopaminérgica en un modelo roedor de la PD (Gantner et al., 2020). Asimismo, se ha evaluado el cotrasplante de fVM de ratas con células encapsuladas que secretan GDNF, en un intento de aumentar la supervivencia del injerto (Widmer, 2018).

En el mismo sentido, un nuevo acercamiento del uso de GDNF para mejorar la supervivencia de las DaN derivadas de ESC, es la expresión y secreción de este NTF por las mismas ESC. De tal manera que las células promuevan su función dopaminérgica y su supervivencia mediante una señalización autócrina.

Recientemente, este enfoque fue investigado por Lara-Rodarte y colaboradores, quienes estudiaron el efecto de la expresión constitutiva del GDNF en mESC. Demostraron que hay un efecto positivo durante la diferenciación dopaminérgica, además de que confiere neuroprotección a las DaN diferenciadas ante 6-OHDA en ensayos *in vitro*. Asimismo, se observó que el trasplante de las DaN derivadas de mESC-GDNF en el estriado de ratas hemiparkinsonianas mejora los síntomas motores de los animales y, además; el volumen del injerto, el número de DaN en el estriado y su proporción en el injerto fueron mayores en la condición de sobreexpresión del GDNF en comparación con el control (Lara-Rodarte et al., 2021). Este estudio demostró, en resumen, el papel positivo del GDNF durante la diferenciación dopaminérgica y en la supervivencia de las DaN después del trasplante. No obstante, cabe señalar que, si bien el número de células TH positivas aumentó con la expresión de GDNF, esta diferencia no tuvo ningún efecto en las pruebas realizadas en los roedores ni tampoco elevó la liberación de dopamina.

Esto pudiera sugerir la necesidad de una estrategia más eficiente como la expresión regulada del GDNF.

1.4.3 Regulación del sistema dopaminérgico por GDNF.

Aunado a todos los efectos positivos sobre las neuronas dopaminérgicas, el GDNF también interfiere en la homeostasis de la dopamina a diferentes niveles. Entre sus mecanismos, puede reducir la actividad del Transportador de dopamina (Littrell et al., 2012), estimular la fosforilación de la TH y, por tanto, activarla (Gordon et al., 2008); además de incrementar la liberación de DA provocada por Ca^{2+} mediante la inhibición de los canales de K^{+} (Yang et al., 2001). En consecuencia, la sobreexpresión del GDNF puede conducir a mecanismos compensatorios que afectan la función dopaminérgica de las neuronas (Tenenbaum & Humbert-Claude, 2017). Se ha reportado que la liberación prolongada del GDNF en el estriado intacto de roedores reduce la expresión de TH e incluso disminuye los niveles de DA (Rosenblad et al., 2003; Sajadi et al., 2005). Además, se ha demostrado que en ratas hemiparkinsonianas la extensa sobreexpresión de este NTF no sólo disminuye la expresión de TH, sino que también induce un crecimiento axonal aberrante (Georgievska et al., 2002; Tenenbaum & Humbert-Claude, 2017).

Sin embargo, estudios posteriores en donde se regula la expresión sostenida de GDNF, revelaron que no alteraba los niveles de mRNA de la TH, pero sí se inducía una regulación a la baja de los niveles de DA, así como de la actividad DAT (Barroso-Chinea et al., 2016). Bajo el mismo enfoque, otros autores reportaron que el suministro farmacológico discontinuo del GDNF en ratas lesionadas con 6-OHDA permitió reducir los síntomas motores sin disminuir la transcripción de TH (Tereshchenko et al., 2014). Estos estudios exhiben la necesidad de que las futuras investigaciones que busquen promover la función dopaminérgica de las DaN y mejorar su supervivencia después del trasplante, deben considerar la expresión regulada del GDNF y, de esta forma, prevenir los efectos secundarios a largo plazo por su sobreexpresión.

1.5 Expresión inducible en hESC.

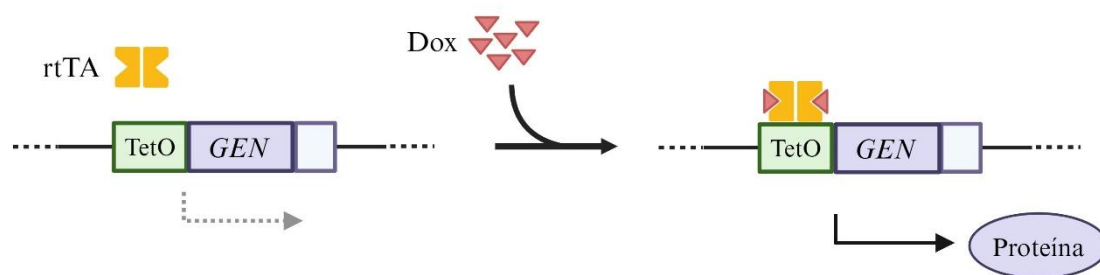
Los sistemas de expresión inducible en células eucariotas son una herramienta útil en aplicaciones biomédicas como la terapia génica, ya que pueden aumentar su eficiencia al regular la expresión transgénica y reducir los efectos secundarios de la sobreexpresión o su expresión ectópica espaciotemporal. Entre los sistemas de expresión inducible utilizados en células de mamífero, se encuentran los inducibles por tetraciclina, los estimulados por cumato, los regulados por interacción proteína-proteína y aquellos inducibles por tamoxifen (Kallunki et al., 2019).

1.5.1 Operón de resistencia a tetraciclina en *E. coli*.

El sistema regulado por tetraciclina está basado en dos elementos, la proteína represora Tet (TetR) y el operador tet (tetO) que controlan el operón de resistencia a tetraciclina codificado por Tn10 de *Escherichia coli* (Das et al., 2016). Este operón contiene los genes que expresan TetR y TetA, esta última es la proteína membranal encargada de expulsar la tetraciclina. TetR tiene alta afinidad por la secuencia tetO, lo que permite una represión eficiente de la expresión de TetA. Por tanto, en presencia de tetraciclina, ésta se une al dímero de TetR en el que desencadena un cambio conformacional que impide su unión a tetO. Como consecuencia, el TetR deja de suprimir los promotores y se expresan TetA y TetR.

1.5.2 Sistema TetOn.

El sistema TetOn se desarrolló mediante mutagénesis aleatoria, de manera que se obtuvo un activador transcripcional reverso regulado por tetraciclina (rtTA, del inglés *reverse tetracycline-regulator transcriptional activator*) que presenta una función transcripcional inversa a tetR, tal que no se une a tetO en ausencia del efector (Gossen et al., 1995). La unión de tetraciclina o un análogo como la doxiciclina (Dox), desencadena un cambio conformacional en la proteína rtTA que permite su unión a tetO, consecuentemente, la activación del promotor impulsa la expresión del gen posicionado río abajo (**figura 4**) (Das et al., 2016; Gossen et al., 1995).



4. **Figura 4.** Sistema TetOn.

El sistema TetOn se basa en la actividad de un activador transcripcional reverso (rtTA) que no se une al operador Tet (TetO) en ausencia de doxíciclina (Dox). La afinidad del rtTA por Dox desencadena un cambio conformacional en la proteína que permite su unión al TetO promoviendo así la expresión del gen río abajo. Este sistema permite regular la expresión de un gen de interés en ventanas de tiempo cortas.

Desde su desarrollo, se ha reportado el establecimiento de líneas transgénicas con el sistema TetOn en hESC para el estudio de su pluripotencialidad y su capacidad de diferenciación después de la modificación genética (Fu et al., 2008; Guo et al., 2017; Vieyra & Goodell, 2007). En un trabajo, se establecieron iPSC con este sistema para regular la expresión de GDNF en progenitores neurales que fueron trasplantados en el cerebro de roedores (Akhtar et al., 2018). Se demostró que la actividad transgénica puede inducirse y revertirse en múltiples ciclos *in vivo*, por lo que, al trasladarse al nivel clínico, podría otorgar protección para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la PD.

Hasta la fecha, se desconoce un estudio que incluya la expresión regulada del GDNF en hESC para mejorar la función dopaminérgica de las DaN diferenciadas y aumentar su supervivencia a través de la señalización autócrina. Este enfoque innovador, que combina terapia génica inducible y terapia de reemplazo celular en el contexto de la enfermedad de Parkinson (PD), podría mejorar los resultados de los estudios preclínicos, evitando los efectos adversos derivados de la sobreexpresión de GDNF y confirmando su papel trófico y neuroprotector en estas condiciones. Para generar hESC que expresen GDNF de manera regulada, en este trabajo nos centramos inicialmente en establecer el sistema TetOn en hESC para regular la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés)

como reportera. Una vez constituido, el objetivo es generar una línea estable de hESC con el sistema TetOn para regular la expresión de GDNF.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En un trabajo reciente, se demostró que la expresión constitutiva del GDNF en DaN diferenciadas de mESC promueve la diferenciación dopaminérgica y confiere neuroprotección contra la 6-OHDA *in vitro*. Además, su trasplante en un modelo animal de la PD aumenta el número de DaN en el injerto y mejora de los síntomas motores de los animales (Lara-Rodarte et al., 2021), evidenciando que el GDNF es un inductor de la diferenciación dopaminérgica y que incrementa la supervivencia de las DaN diferenciadas luego del trasplante. Sin embargo, se ha reportado que su sobreexpresión puede conducir a mecanismos compensatorios como una regulación a la baja de los niveles de dopamina y de la actividad DAT (Tenenbaum & Humbert-Claude, 2017), además de la reducción transcripcional de TH (Georgievska et al., 2002). Por ello, consideramos relevante implementar un sistema para regular la expresión del GDNF y evitar dichos efectos negativos. En este proyecto, se pretende generar hESC transgénicas estables con el sistema TetOn para la expresión inducible de la proteína reportera GFP que, posteriormente, podrá utilizarse para la expresión regulada del GDNF.

III. JUSTIFICACIÓN.

La enfermedad de Parkinson se produce por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*, reduciendo el suministro de dopamina en el estriado y ocasionando los síntomas motores característicos. El trasplante de DaN derivadas de células troncales embrionarias humanas se ha evaluado como una alternativa al tratamiento farmacológico de la PD. Sin embargo, un porcentaje bajo de estas neuronas sobreviven después del trasplante debido al pobre soporte trófico. Se ha demostrado que el GDNF promueve la supervivencia de las DaN *in vitro* e *in vivo* y su expresión constitutiva en ESC protege a las DaN diferenciadas contra neurotoxinas, aumenta su proporción en el mesencéfalo

después del trasplante y mejora los síntomas motores en modelos animales de la PD. No obstante, la sobreexpresión del GDNF conduce a mecanismos compensatorios reduciendo la función dopaminérgica de las neuronas. Por esta razón, es idóneo regular la concentración y la expresión de GDNF para prevenir la disminución de la liberación de dopamina en los injertos. El sistema de expresión inducible TetOn es una herramienta ideal para este objetivo, mediante el cual, se podrán obtener hESC que expresen GDNF de manera inducible. En un primer acercamiento, se busca establecer este sistema en hESC de la línea celular H9 para regular la expresión de la proteína reportera GFP.

IV. HIPÓTESIS.

La inserción del sistema TetOn en células troncales embrionarias humanas permitirá la expresión de GFP por la adición de doxíciclina.

V. OBJETIVOS.

a. General

Generar clones de hESC con el sistema TetOn para la expresión inducible de la proteína reportera GFP por doxíciclina.

b. Particulares

- i. Estandarizar las condiciones para la transfección de los plásmidos pAAVS1-rtTA y pXAT2 y su selección por antibiótico.
- ii. Generar clones que expresen rtTA de manera constitutiva y GFP de manera inducible.
- iii. Evaluar el sistema TetOn para la expresión inducible de GFP por doxíciclina.
- iv. Obtener el vector TetO-GDNF por clonación molecular.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Expansión, purificación y análisis por restricción de plásmidos.

Las bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5 α (NEB Cat. C2987I) fueron transformadas por choque térmico con los plásmidos de interés (Tabla 1; Anexo 1), se sembraron en placas de 10 cm con medio LB agar suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (Sigma Aldrich Cat. A0166) y se incubaron a 37°C por 16 horas. Se recuperaron una o dos colonias, las cuales se incubaron en medio LB líquido (Invitrogen Cat. 12780052) con 100 μ g/ml ampicilina a 37°C y 250 rpm por 16 horas. Los plásmidos fueron purificados por maxi-prep con el Plasmid Maxi Kit (QIAGEN Cat. 12163), de acuerdo con el protocolo del proveedor. Para los ensayos de restricción, se incubaron 500 ng de DNA con las endonucleasas PstI (NEB Cat. R0744S), NcoI (NEB Cat. R0193S), FseI (NEB Cat. R0588S), SpeI (NEB Cat. R0133L), ScaI (NEB Cat. R3122L) o SalI (NEB Cat. R3138S), según correspondía para cada uno, a 37°C por 30 minutos. Todas las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Elementos contenidos	Función
pTSDCH+GDNF	Secuencia codificante para GDNF	Expresión de GDNF (usado para la clonación molecular)
pAAVS1-rtTA	Secuencia codificante para rtTA Secuencias de homología al <i>locus</i> AAVS1 Gen de resistencia a Neomicina	Expresión constitutiva del rtTA Integración del transgén al genoma humano mediante recombinación homóloga. Selección por antibiótico
pXAT2	RNA guía para el <i>locus</i> AAVS1 Secuencia codificante para Cas9	Sistema CRISPR-Cas9 para la integración dirigida del transgén al <i>locus</i> AAVS1 humano
pTetO-EGFP	Secuencia codificante para EGFP bajo el operador TetO	Expresión inducible de GFP mediante el sistema TetOn
PB-Booster V2/rtTA	Secuencia codificante para rtTA Elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) seguido de un sitio múltiple de clonación Secuencias de reconocimiento por transposasa	Expresión constitutiva del rtTA Expresión constitutiva de Venus Clonación del GDFN bajo TRE
pCAG-hypBase	Secuencia codificante para transposasa hiperactiva	Expresión de transposasa hiperactiva

6.2 Construcción de los vectores TetO-GDNF y TRE-GDNF.

Para obtener el vector con GDNF bajo el operador TetO (TetO-GDNF), se amplificó la secuencia codificante para GDNF añadiendo los sitios de restricción para NcoI en 5' y para BsrGI en 3' mediante PCR punto final de 35 ciclos, a partir de 100 ng del plásmido pTSDCH+GDNF (Anexo 1, primer lugar), con los primers Fw 5'-CCATGGGCGGACGGGACTCTAAG-3' y Rv 5'-TGTACATCAGATACATCCACACCGTT-3' con T_m de 63°C. El amplicón fue purificado con el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN Cat. 28104) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El plásmido receptor pTetO-EGFP (Anexo 1, cuarto lugar) y el amplicón purificado fueron digeridos con las enzimas NcoI (NEB Cat. R0193S) y BsrGI (NEB Cat. R0575S) por 4 horas a 37°C, las bandas correspondientes fueron recuperadas del gel de agarosa al 1% y purificadas con el QIAquick Gel Extraction Kit. El vector y el inserto se ligaron en proporción 1:3 o 1:5 con el Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific Cat. #K1423) siguiendo el protocolo del proveedor. Se transformaron bacterias competentes con el producto mediante choque térmico y se sembraron en placas de LB agar con 100 µg/ml de ampicilina, las cuales fueron incubadas a 37°C por una noche.

Alternativamente, se realizó la clonación del cDNA de GDNF en el plásmido PB-Booster V2/rtTA (Anexo 1, quinto lugar) entre el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) y el rtTA que, a su vez, se encuentra bajo el promotor constitutivo PGK (Covarrubias et al., 2021). El producto de esta clonación fue el vector TRE-GDNF. Para ello, el plásmido pTSDCH+GDNF fue digerido con BamHI (NEB Cat. R0136S), el fragmento de interés se purificó y fue sometido a una segunda digestión con EcoRV (NEB Cat. R0195S). La banda correspondiente fue recuperada y purificada. Para obtener el vector receptor, el plásmido PB-Booster/rtTA fue digerido con BamHI y EcoRV y se purificó la banda de la longitud esperada. El vector e inserto fueron ligados en proporción 1:3 con la T4 DNA ligasa (NEB Cat. M0202S) a 16°C toda la noche. Se transformaron bacterias competentes con el producto mediante choque térmico y fueron sembradas en medio LB agar con 100 µg/ml de ampicilina. Los plásmidos PB-Booster V2/rtTA y pCAG-hypBase fueron donados por el Dr. Luis Covarrubias.

6.3 Cultivo celular de hESC.

Las células troncales embrionarias humanas de la línea celular H9 (hESC-H9) de pasaje 32, se mantuvieron en cultivo sobre matrigel (Corning Cat. 354277) y con el medio químicamente definido mTeSR™1 (STEMCELL Technologies Cat. 85850) por al menos dos semanas antes de proceder con algún tratamiento. Se realizaron subcultivos cada 4-5 días disociando las células en suspensión de célula única con TrypLE express (Gibco Cat. 12604013), se recolectaron por centrifugación (1000 rpm por 5 min) y se sembraron manteniendo una razón 1:10 en la placa de cultivo de destino. Después de cada subcultivo, el medio se complementó con 10 μ M del inhibidor de la Proteína Cinasa dependiente de Rho (iROCK) (Y-27632 de Sigma Cat. Y0503) por 24 horas. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C y 5% CO₂. Se emplearon las mismas condiciones de cultivo durante y después de la manipulación de las hESC-H9.

6.4 Curva de supervivencia por tratamiento con antibiótico.

Un total de 2×10^5 hESC-H9 se sembraron en un área de 3.5 cm² y fueron tratadas con 0, 50, 100, 150 o 200 μ g/ml de G418 (Sigma Aldrich Cat. A1720) diariamente por 14 días. Al día 14, las células sobrevivientes de cada condición se disociaron y se cuantificaron mediante exclusión de azul tripano al 0.4% para calcular la viabilidad celular. Las células se visualizaron en un microscopio óptico invertido y se documentaron los resultados. El experimento se realizó por triplicado y se calculó el porcentaje promedio de viabilidad $\pm$ SEM.

6.5 Estandarización de la transfección de hESC-H9.

Se determinó la eficiencia de transfección del plásmido reportero pGFPmax mediante lipofección y nucleofección. Para la lipofección, se evaluaron dos reactivos distintos: Lipofectamina 2000 Reagent (Invitrogen Cat. 11668-019) y Lipofectamina LTX & PLUS™ Reagent (Invitrogen Cat. 15338-100). En ambos casos, se siguió un protocolo similar, de acuerdo con el proveedor. Se sembraron hESC-H9 en un área de 9.6 cm² hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se diluyeron 1.5 μ g del

plásmido en medio mTeSR™1 y se preparó una mezcla en proporción 1:1 con la lipofectamina correspondiente diluida en medio. Las hESC-H9 fueron tratadas con esta solución e incubadas por 24 horas, luego de las cuales se retiró el medio y se identificaron las células GFP positivas.

Para llevar a cabo la nucleofección, se evaluaron dos buffers distintos. El primero estaba diseñado específicamente para la transfección de células, compuesto por 120 mM de KCl, 10 mM de KH₂PO₄, 2 mM de EGTA, 25 mM de HEPES, 5 mM de MgCl₂ y 0.5 mM de CaCl₂, con un pH de 7.5-7.6. Este buffer fue proporcionado por el Dr. Julio Morán. El segundo buffer formaba parte del Amaxa Human Stem Cell Nucleofector Starter Kit (Lonza, Cat. VPH-5012). Un total de 1×10⁶ células fueron recolectadas y resuspendidas en 100 µl del buffer correspondiente. A la mezcla se añadieron 1.5 µg del plásmido reportero pGFPmax, y el volumen total se transfirió a una celda que fue sometida al programa A-23 del Nucleofector II (Lonza, Cat. AAD-1001S). Inmediatamente después, las células se sembraron en un área de 3.5 cm² y se complementó el medio con 10 µM de iROCK. Al día siguiente, se identificaron las células positivas para GFP mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U).

Todas las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Para calcular la eficiencia de transfección, se cuantificó el número de células GFP positivas respecto al total de células vivas en al menos 3 campos distintos y se graficó el promedio.

6.6 Transfección de hESC-H9 por nucleofección.

Los plásmidos pAAVS1-rtTA, pXAT2, pTetO-EGFP y pGFPmax fueron transfectados mediante nucleofección con el Amaxa Human Stem Cell Nucleofector Starter Kit (Lonza Cat. VPH-5012), de acuerdo con el protocolo del proveedor. En resumen, las células se recolectaron por centrifugación y se cuantificó la viabilidad con azul tripano al 0.4%. Un total de 1×10⁶ células fueron nucleofectadas para cada una de tres condiciones distinta (**Tabla 2**).

Tabla 2. Condiciones de transfección mediante nucleofección.

Condición	Plásmidos nucleofectados	Objetivo final
1 Control de transfección	5 µg pGFPmax	Calcular la eficiencia de transfección y utilizarlo como control negativo de la selección con antibiótico
2 Transfección	1 µg pXAT2 + 3 µg pAAVS1-rtTA	Dirigir la integración del rtTA al <i>locus</i> AAVS1 del genoma.
3 Co-transfección	1 µg pXAT2 + 2 µg pAAVS1-rtTA + 2 µg pTetO-EGFP	Inducir la expresión de GFP por doxiciclina transitoriamente

El plásmido pTetO-EGFP fue linealizado previamente con la endonucleasa Scal (NEB Cat. R3122L). La cantidad estimada de células fue recolectada y resuspendida en 100 µl del buffer de transfección en una celda especial. Para cada condición, se agregó la cantidad correspondiente de los plásmidos y se mezcló pipeteando suavemente, luego se sometió al programa A-23 del Nucleofector II (Lonza Cat. AAD-1001S). En seguida, se sembraron las células de cada condición en un área de 3.5 cm², complementando el medio con 10 µM de iROCK. A las 24 horas, se identificaron las células GFP positivas en la condición 1. Luego de 48 horas se realizó un subcultivo de todas las células en un área de 9.6 cm². Las células se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) y se documentaron los resultados. Para calcular la eficiencia de transfección, se cuantificó el número de células GFP positivas respecto al total de células vivas. Todas las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

6.7 Selección por antibiótico y selección clonal

Se comenzó la selección por antibiótico de las hESC-H9 transfectadas luego de 96 horas. Para cada condición, se agregaron 100 µg/ml de G418 (Sigma Aldrich Cat. A1720) durante los primeros 7 días y 150 µg/ml a partir del día 8 y hasta el 14. La condición 1 se utilizó como control interno de la selección. Las células se visualizaron en un microscopio invertido y se documentaron los resultados.

En la condición 2, (pXAT2 + pAAVS1-rtTA; Tabla 2) se retiró el antibiótico y las hESC-H9 se mantuvieron por 7 días más para su recuperación. Posteriormente, las células resistentes se sembraron a baja densidad (200 cél/ml) en un área de 21.5 cm² y se mantuvieron en cultivo por 12 días para dejar crecer colonias aisladas. Un total de 24 colonias fueron recuperadas y sembradas cada una en un pozo de una placa de 96 multipozos. Cada clona se continuó expandiendo por separado en placas de cultivo de áreas mayores (24 y 12 multipozos) hasta alcanzar el 90% de confluencia. A lo largo del proceso, 6 clonas perdieron la morfología típica de las hESC y no fue posible rescatarlas, por lo que se continuó el protocolo con las 17 clonas restantes. Aproximadamente 5x10⁵ células de cada clona fueron disociadas y lisadas para la extracción de DNA genómico siguiendo el protocolo del kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN Cat. 69504), el resto de las células fueron congeladas en medio mTeSR™1 con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenadas en nitrógeno líquido.

6.8 Inducción temporal de la expresión GFP simultánea a la selección.

Además del antibiótico G418 para la selección después de la transfección, la condición 3 (co-transfección; pXAT2 + pAAVS1-rtTA + pTetO-EGFP) fue tratada con 1 µg/ml de doxíciclina (Sigma Aldrich Cat. D5207) al día 5 post transfección para inducir transitoriamente la expresión de GFP. Se identificaron las células GFP positivas en el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) a las 24, 48 y 72 horas después de la inducción y se documentaron los resultados. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

6.9 Genotipificación de clonas transfectadas.

Se amplificó un fragmento del *locus* original (sin modificar, de aproximadamente 1.4 kb), así como una fracción de éste después de la integración del transgén, abarcando un fragmento de 1.2 kb aproximadamente (*locus* modificado) para genotipificar las clonas recuperadas. Para ello, 100 ng de DNA genómico aislado de cada clona se sometió a PCR punto final con los *primers* correspondientes (Tabla

3), utilizando la DNA polimerasa Platinum™ Taq Green Hot Start (Invitrogen, Cat. 11966-018) y con las siguientes condiciones de reacción: 7 min 94°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 45 seg, 30 seg con la Tm adecuada y 72°C por 90 seg.

Tabla 3. Primers para la genotipificación de clonas.

Primer	Secuencia 5' – 3'	Tm	Longitud del amplificado	Locus AAVS1
locus AAVS1 fw	GACTTCCCCTCTTCCGATGTTGA	59°C	1.4 kb	Sin modificar
locus AAVS1 rv	CTCAGGTTCTGGGAGAGGGTAG			
locus AAVS1 fw	GACTTCCCCTCTTCCGATGTTGA	61°C	1.2 kb	Modificado
AAVS1 rv mod	GAGCCTAGG GCCGGGATTCTC			

Las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y se documentaron los resultados.

6.10 Transfección de pTetO-EGFP e inducción de la expresión de GFP por doxyciclina.

Se seleccionaron las clonas 2 y 3, que no presentaron un amplificado en el *locus wildtype* (WT) pero sí uno de 1.2 kb después de la integración del transgén (clonas positivas), así como la clona 16 que se utilizó como prueba para la validación del sistema TetOn. Estas células, denominadas hESC-H9-rtTA, fueron descongeladas y mantenidas en cultivo por una semana para su recuperación y expansión. Durante este tiempo, se eliminaron aquellas células que presentaron una morfología distinta a la característica para hESC. Posteriormente, 1×10^6 células de cada clona fueron transfectadas con 2 µg del plásmido pTetO-EGFP linealizado previamente con la endonucleasa *ScaI* (NEB Cat. R3122L), con el Amaxa Human Stem Cell Nucleofector Starter Kit (Lonza Cat. VPH-5012), como se describió anteriormente. A las 48 horas se realizó un subcultivo de todas las células en un área de 9.6 cm² y al día siguiente, se comenzó el tratamiento con 1 µg /ml de doxyciclina (Sigma Aldrich Cat. D5207), es decir, al día 3 post transfección. Se localizó la fluorescencia a las 2, 6, 12 y 24 horas para identificar aquellas células que expresaran GFP en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) y se documentaron los resultados.

6.11 Evaluación del sistema TetOn para la expresión regulada de GFP.

La clona 16 fue transfectada con 2 µg de plásmido pTetO-EGFP, linealizado con la endonucleasa Scal (NEB Cat. R3122L), o con 2 µg del plásmido circular, utilizando nucleofección con el Amaxa Human Stem Cell Nucleofector Starter Kit (Lonza Cat. VPH-5012), siguiendo el protocolo descrito en secciones anteriores. En esta ocasión, las células de cada condición se sembraron en dos pozos distintos de una placa de 48 multipozos. Al día siguiente de la transfección, uno de los pozos fue tratado con 1 µg/ml de doxíciclina (Sigma Aldrich Cat. D5207) para inducir la expresión de GFP, la cual fue monitoreada a las 12 y 24 horas posteriores a la inducción. A las 48 horas post-transfección, se subcultivaron las células de ambos pozos en un área de 9.6 cm², y se retiró la doxíciclina en las condiciones tratadas. Se localizaron las células que expresaran GFP, luego de 24 y 36 horas sin el antibiótico. Las células hESC-H9-rtTA se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) y se capturaron un total de 5 campos distintos cada vez. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Se calculó el porcentaje de células GFP positivas respecto al total de células de cada campo en todos los tiempos evaluados y se graficó el promedio.

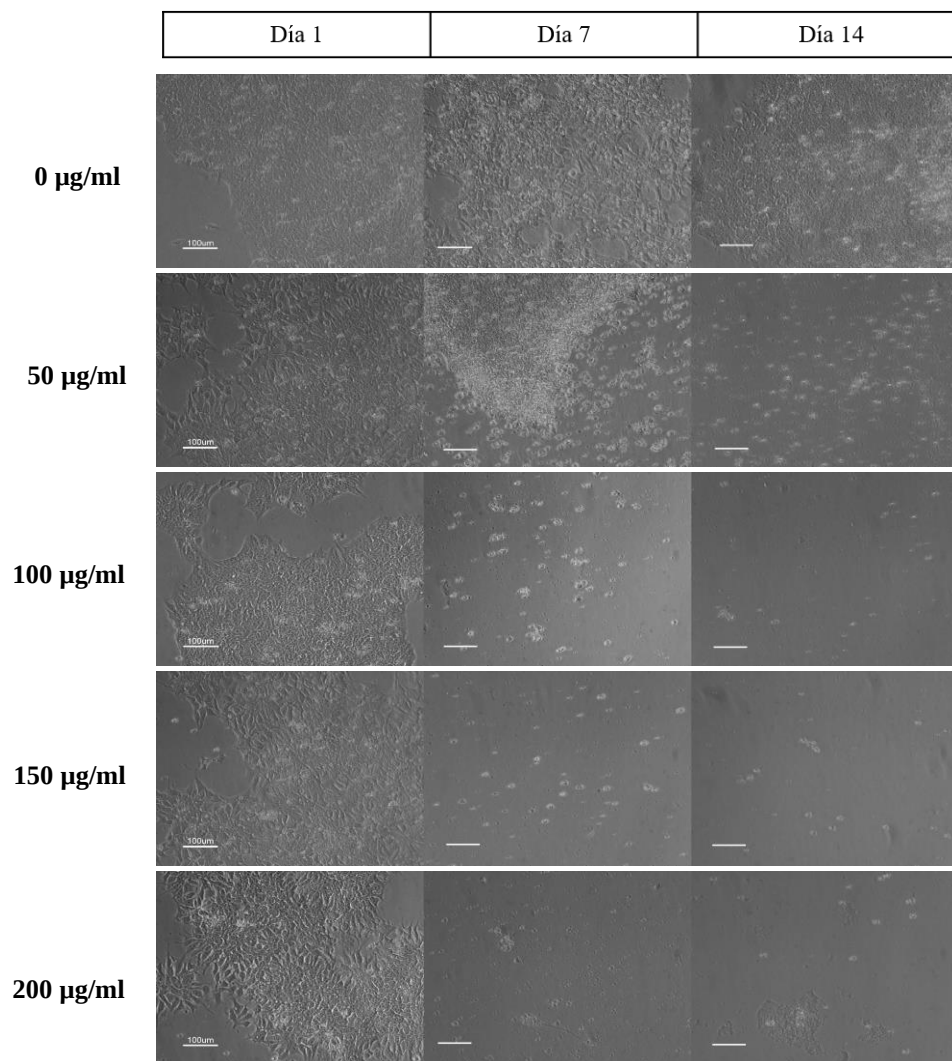
VII. RESULTADOS.

7.1 Estandarización de condiciones para la transfección de hESC-H9 y su selección por antibiótico.

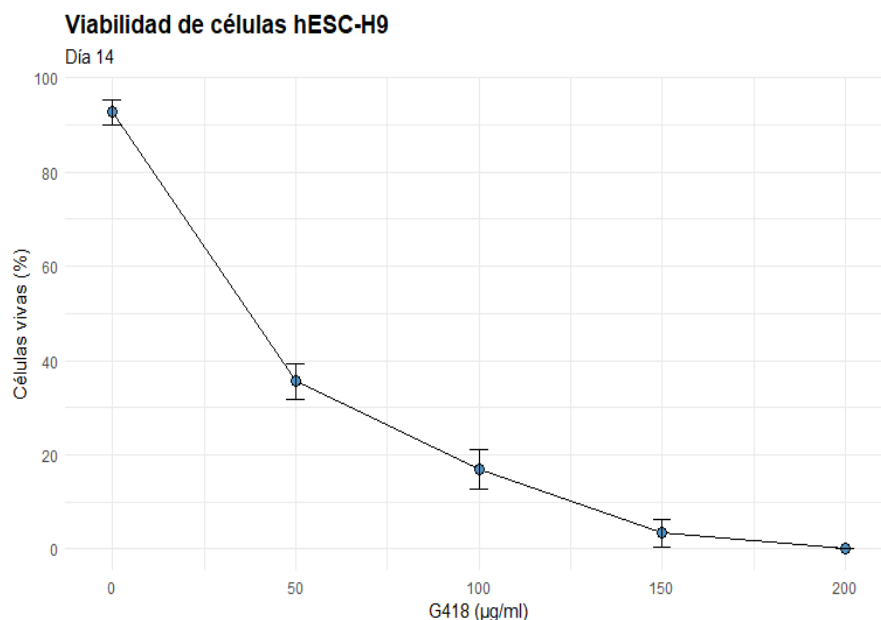
En primer lugar, se definió la concentración adecuada de antibiótico para la selección post-transfección de las hESC-H9, para lo cual se realizó una curva de supervivencia celular después del tratamiento con concentraciones crecientes del antibiótico G418 (análogo de neomicina) por 14 días en las células sin transfectar. En el día 1, se observaron colonias celulares grandes con bordes definidos en todas las condiciones. En el interior de las colonias, las células eran pequeñas y compactas. Desde el inicio del tratamiento y a lo largo de la primera semana, las células se fueron desprendiendo en las condiciones con el antibiótico. Al día 7, el número de células vivas se redujo drásticamente en todos los tratamientos, aunque

todavía se apreciaron colonias pequeñas a 50 µg/ml. Durante la segunda semana, se apreció cada vez menos células muertas, aunque esto se relacionaba directamente con la cantidad de células vivas restantes. Finalmente, en el día 14 había únicamente células muertas en las últimas tres condiciones y unas pocas sobrevivientes con 50 µg/ml del antibiótico (**figura 5A**). En cambio, el control (0 µg/ml) permaneció similar desde el primer día. La cuantificación de la viabilidad celular (**figura 5B**) mostró una supervivencia del $35.55\% \pm 3.8$ con 50 µg/ml, la menor concentración de G418, mientras que a 100 µg/ml, ésta se redujo a $16.9\% \pm 4.1$. Sólo el 3.33% de las células sobrevivieron con 150 µg/ml del antibiótico, aunque con un error estándar de ± 3 , lo que sugiere que en realidad las hESC-H9 no subsisten a dicha concentración. De manera similar, no se encontraron células vivas con el tratamiento a 200 µg/ml. Con estos datos, se determinó seleccionar las hESC-H9 transfectadas con 100 µg/ml de G418 durante los primeros 7 días y con 150 µg/ml en los siguientes siete, para asegurarse de que aquellas células vivas hayan integrado el casete de resistencia a neomicina y, con ella, el rtTA de expresión constitutiva.

A)



B)

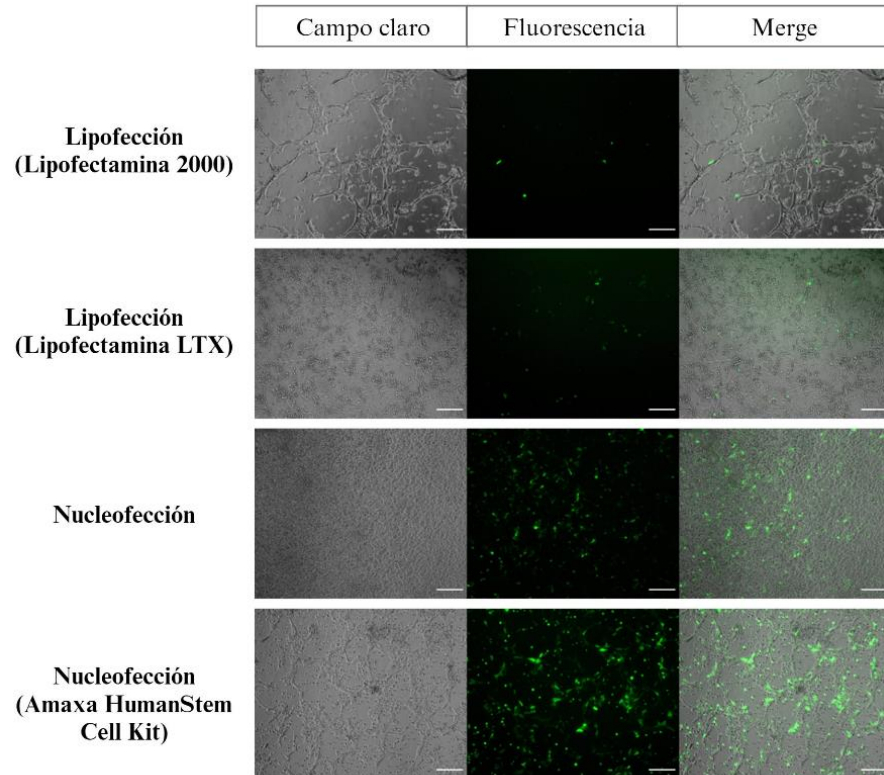


5. **Figura 5.** Viabilidad de hESC-H9 a concentraciones crecientes de G418.

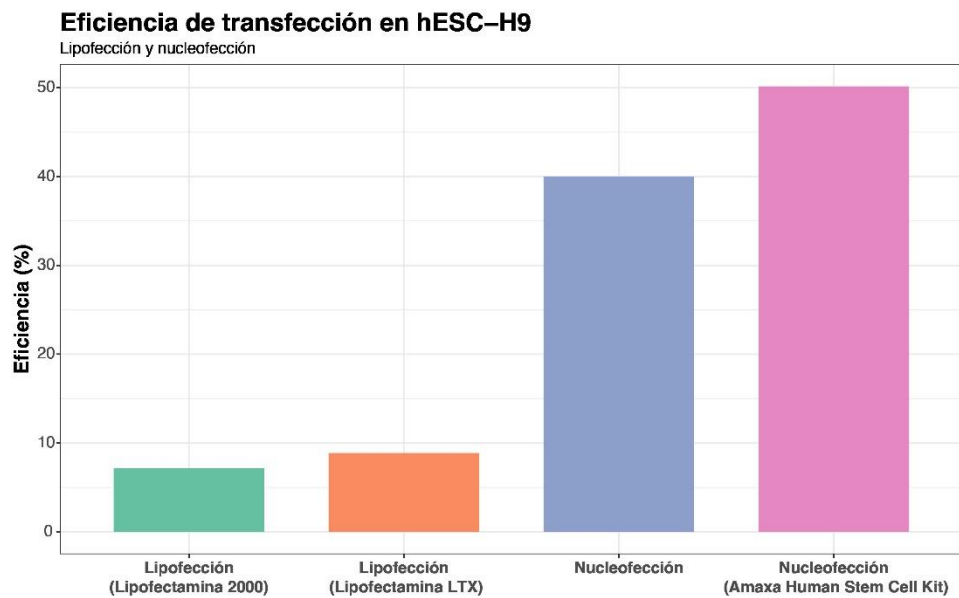
A) Imágenes en campo claro de los tratamientos a distintas concentraciones del antibiótico, se aprecia la muerte progresiva de las células en todos los tratamientos. Barra de escala 100 µm. **B)** Curva de supervivencia de las células. La viabilidad es nula a partir de 150 µg/ml de G418.

Se han reportado diversos métodos de transfección en hESC, destacando la electroporación por su mayor eficiencia en comparación con la lipofección, aunque esta última ofrece una mejor viabilidad celular (Tabar et al., 2015). Para los fines de este trabajo, es crucial lograr una supervivencia celular considerable para realizar posteriormente una selección de las células correctamente transfectadas. Por lo tanto, se compararon dos métodos de transfección: uno utilizando lipofectamina 2000 y lipofectamina LTX, y otro mediante nucleofección, empleando un buffer casero y el Amaxa Human Stem Cell Nucleofector Starter Kit. Todos los ensayos se realizaron con el plásmido reportero pGFPmax. Las imágenes representativas de cada método muestran que, en general, la nucleofección es más eficiente respecto a la lipofección (**figura 6A**).

A)



B)



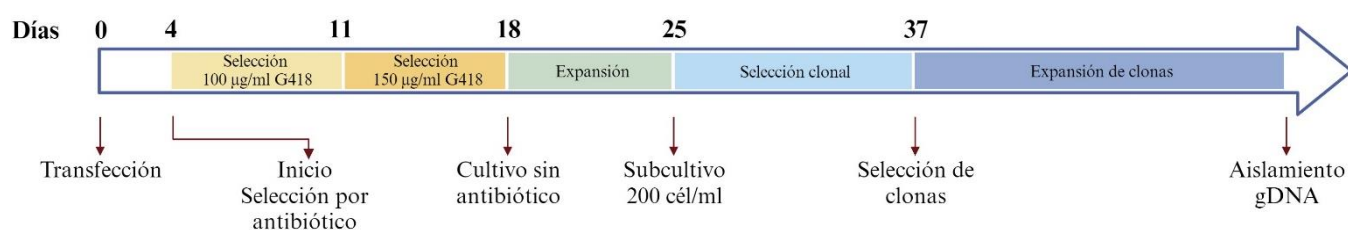
6. Figura 6. Eficiencia de transfección en hESC-H9.

A) Células GFP+ al día 1 post transfección. Barra de escala 200 μ m. **B)** Eficiencia de transfección de los distintos métodos. La nucleofección muestra mayor eficiencia en comparación con la lipofección, siendo el Amata kit el de la mejor eficiencia.

El porcentaje de células GFP positivas fue de 7.17% con la lipofectamina 2000 y de 8.89% con la lipofectamina LTX. Además, se apreciaron cambios morfológicos en las células con la Lipofectamina 2000, en donde los bordes celulares se extendían lateralmente perdiendo su forma compacta usual. En cambio, la eficiencia aumentó a 40% luego de la nucleofección con el buffer casero, aunque con el Amaxa Kit mostró la mayor eficiencia con el 50.14% (**figura 6B**). Se determinó entonces, realizar los ensayos de transfección posteriores con el Amaxa Human Stem Cell Nucleofector Starter Kit como lo recomienda el proveedor.

7.2 Integración del rtTA en hESC-H9 mediante CRISPR-Cas9.

El esquema de la **figura 7** muestra la línea temporal que se siguió para la nucleofección de las hESC-H9 (día 0), la selección por antibiótico G418 (día 4), seguido de la expansión de las células sobrevivientes (día 18) para realizar la selección clonal (día 25) y finalmente aislar DNA genómico después de haber expandido las clonas seleccionadas.



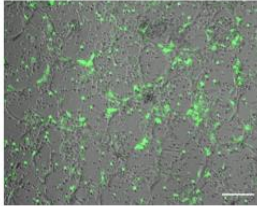
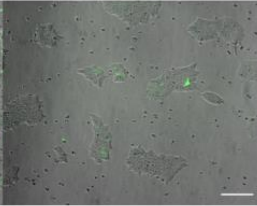
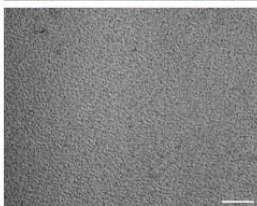
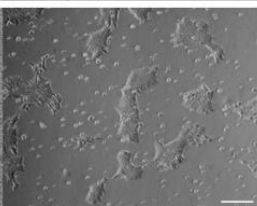
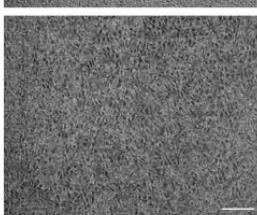
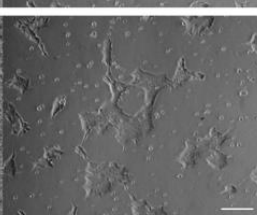
7. **Figura 7.** Línea temporal para generar clonas hESC-H9-rtTA.

Después de 24 horas de transfectar los plásmidos pAAVS1-rtTA y pXAT2, las células estaban confluentes y mostraron una morfología atípica; eran alargadas y no tenían contacto entre ellas. Además, se advirtió gran cantidad de células muertas flotando en el medio (**figura 8A**), muy probablemente debido al estrés al que fueron sometidas aunado al poco espacio en que se sembraron. En cambio, para el día 4 post transfección se formaron colonias pequeñas con bordes definidos de células

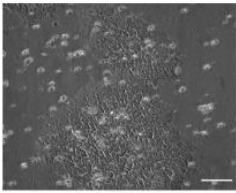
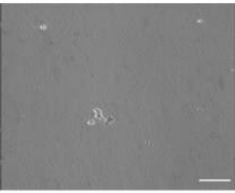
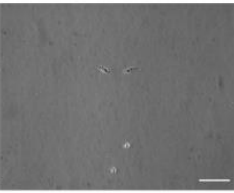
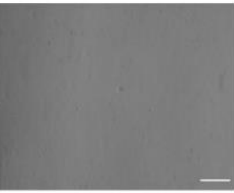
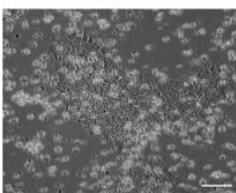
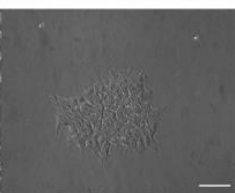
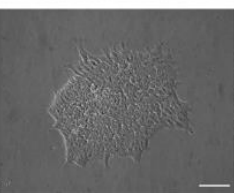
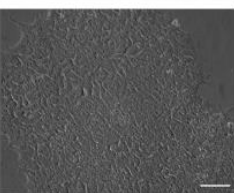
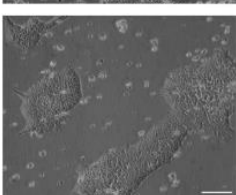
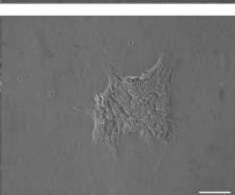
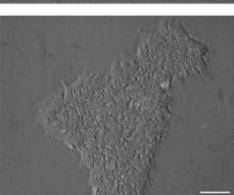
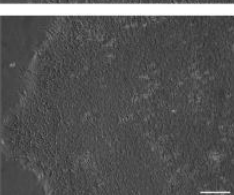
compactas (**figura 8A, derecha**). Cabe mencionar que las células GFP positivas en la condición 1 (control de transfección) disminuyeron significativamente durante estos días hasta que la fluorescencia se disipó completamente en el día 6 (datos no mostrados).

Al día 4 post transfección, se comenzó la selección de las hESC-H9 con 100 µg/ml de G418 para discriminar aquellas células que hubiesen insertado el transgén de interés. Durante los 7 días posteriores, en la condición 1 se observó la muerte progresiva de las células hasta que las colonias redujeron significativamente su tamaño (**figura 8B, arriba**). En la segunda condición (Transfección), se observó una disminución de las colonias celulares y su muerte gradual. Sin embargo, para el día 7, al menos dos colonias conservaron su morfología (**figura 8B, centro**). Por su parte, las células de la condición 3 disminuyeron mucho más en número y tamaño de colonias (en comparación con la condición 2), lo cual se atribuyó al tratamiento simultáneo con los dos antibióticos, G418 y doxiciclina (**figura 8B, abajo**). A partir del día 8, se comenzó con el tratamiento de G418 a 150 µg/ml, con el cual el total de las células murieron en el control de selección (condición 1). En cambio, para la condición 2, se apreció una colonia que comenzó a crecer de manera lenta, pero continua hasta alcanzar un tamaño de aproximadamente 1 mm en el día 14. Se observó un caso similar para la condición 3 (Co-transfección), en la que sobrevivieron dos colonias al último día de selección.

A)

Condición	Objetivo	Día 1 post transfección	Día 4 post transfección
Control de transfección	Transfección eficiente Control de selección		
Transfección	Integración del rtTA al <i>locus AAVS1</i>		
Co-transfección	Inducir expresión GFP temporalmente		

B)

	Día 1	Día 7	Día 8	Día 14
Control de transfección				
Transfección				
Co-transfección				

8. Figura 8. Transfección de hESC-H9 para la integración del rtTA en el locus AAVS1 mediante el sistema CRISPR-Cas9.

A) hESC-H9 a los días 1 y 4 después de la transfección. La fluorescencia disminuye al día 4 debido a la dilución del plásmido reportero. En este día, las células recuperan su morfología. **B)** Selección de las células transfectadas con el antibiótico G418. Las células de las condiciones 2 y 3 son resistentes al antibiótico. Barra de escala 100 μ m.

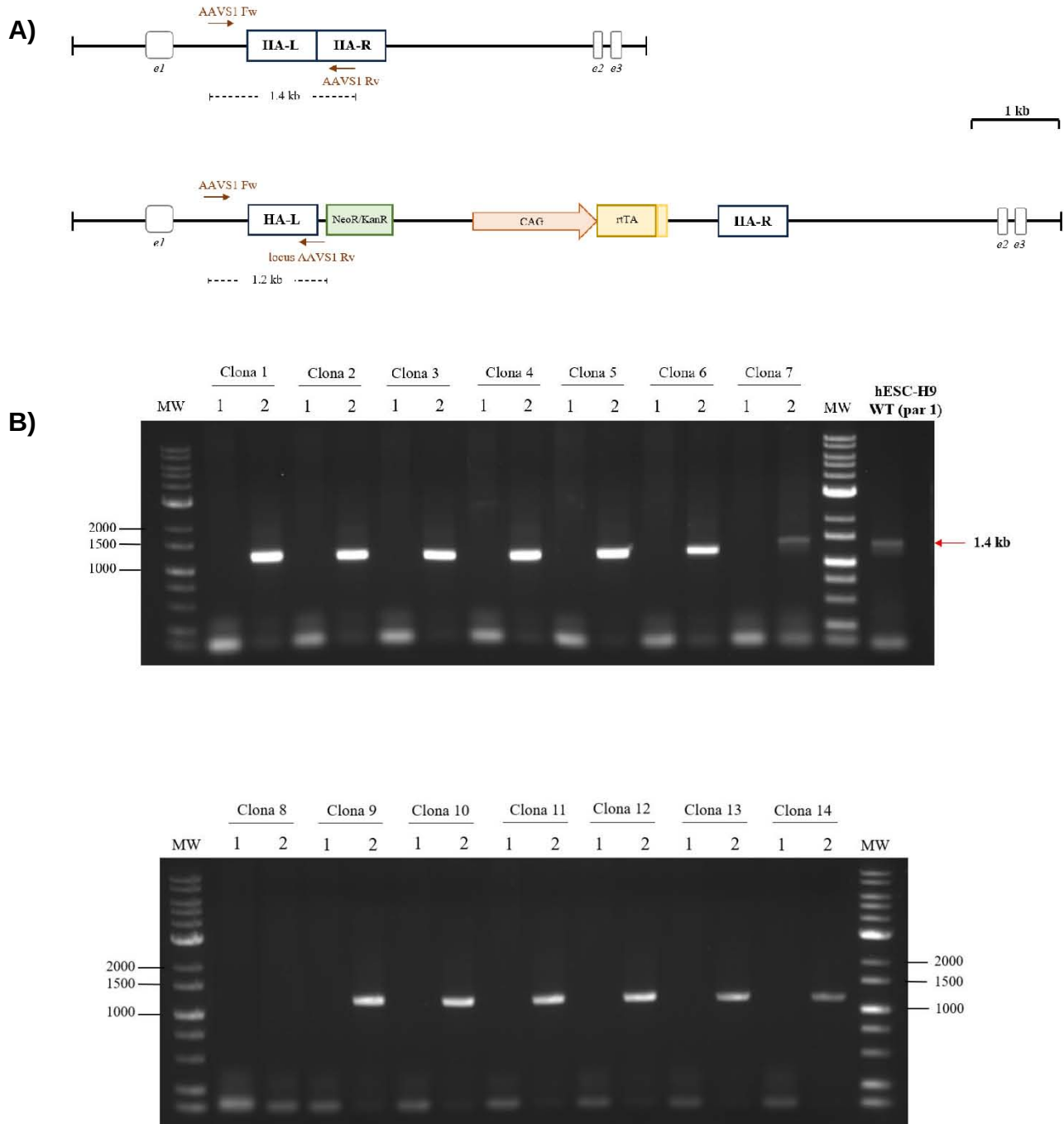
Las células de la colonia sobreviviente en la condición 2 (transfección con pAAVS1-rtTA y pXAT2) se expandieron sin la presencia de antibiótico para facilitar su recuperación. Posteriormente, se subcultivaron a baja densidad (200 células/ml) con el objetivo de generar colonias derivadas de una sola célula, es decir, clonas genéticamente idénticas que hubieran experimentado el mismo evento de recombinación durante la transfección. Como resultado, se obtuvieron 17 clonas viables, que se sembraron en pozos individuales para continuar con su expansión en superficies de cultivo más grandes. Finalmente, todas las clonas fueron sometidas a una evaluación por PCR para su genotipificación.

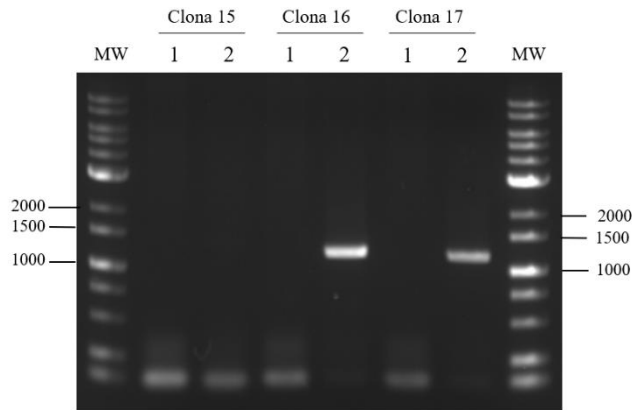
Para identificar las clonas con el gen **rtTA** integrado específicamente en el *locus* AAVS1, se diseñaron dos pares de *primers*. El primer par estaba dirigido a una región que incluía la secuencia de homología derecha del plásmido donador y un fragmento pequeño de la secuencia de homología izquierda, lo que permitía detectar alelos no modificados en el *locus*. Por su parte, el segundo par de *primers* amplificaba un fragmento que abarcaba desde una región adyacente, pero fuera de la primera secuencia de homología, hasta una región antes del casete de resistencia al antibiótico, dentro del transgén. Este diseño permitía identificar alelos con el transgén integrado, al menos hasta el casete de resistencia a neomicina, en la región derecha adyacente al *locus* AAVS1 (**Figura 9A**).

Se esperaba que las clonas positivas homocigotas para el transgén no mostraran amplificación con el primer par de *primers* y presentaran una banda nítida con el segundo par. En ninguna de las 17 clonas analizadas se observó amplificación con el primer par de *primers*, confirmando la ausencia de alelos no modificados. Al evaluar las clonas con el segundo par, se observó una única banda nítida de 1.2 kb en las clonas 1-6, 9-14, 15 y 16. Las clonas 7, 14 y 17 mostraron una banda tenue y en distinta longitud, las cuales se consideraron positivas, pero con posibles eventos genéticos adicionales. En cambio, no se observó ninguna amplificación en las clonas 8 y 15, lo que indicaba que eran clonas negativas (**figura 9B**). En este ensayo, se incluyó la reacción de las hESC-H9 WT con el primer par de *primers* WT

para asegurarse de que amplificaban el *locus* original, en el que se percibió la banda esperada de 1.4 kb (**figura 9B, primer gel**).

Se eligieron, entonces, tres clonas positivas, 2, 3 y 6, además de la clona 16 como prueba para la validación del sistema TetOn.





9. **Figura 9.** Identificación de clonas con la integración del rtTA en el *locus* AAVS1

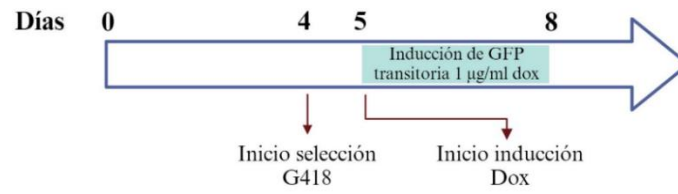
A) Esquema del *locus* AAVS1 sin modificar y después de la integración del rtTA. Se muestran los elementos del transgén, los *primers* para la genotipificación y la longitud del amplificado esperado.

B) Genotipo de las 17 clonas evaluadas por PCR con los *primers* para el *locus* sin modificar (1) y el *locus* modificado (2). Las células hESC-H9 WT se evaluaron con el par 1 para el *locus* sin modificar. Se especifica las longitudes de las bandas de interés del marcador de peso molecular (MW).

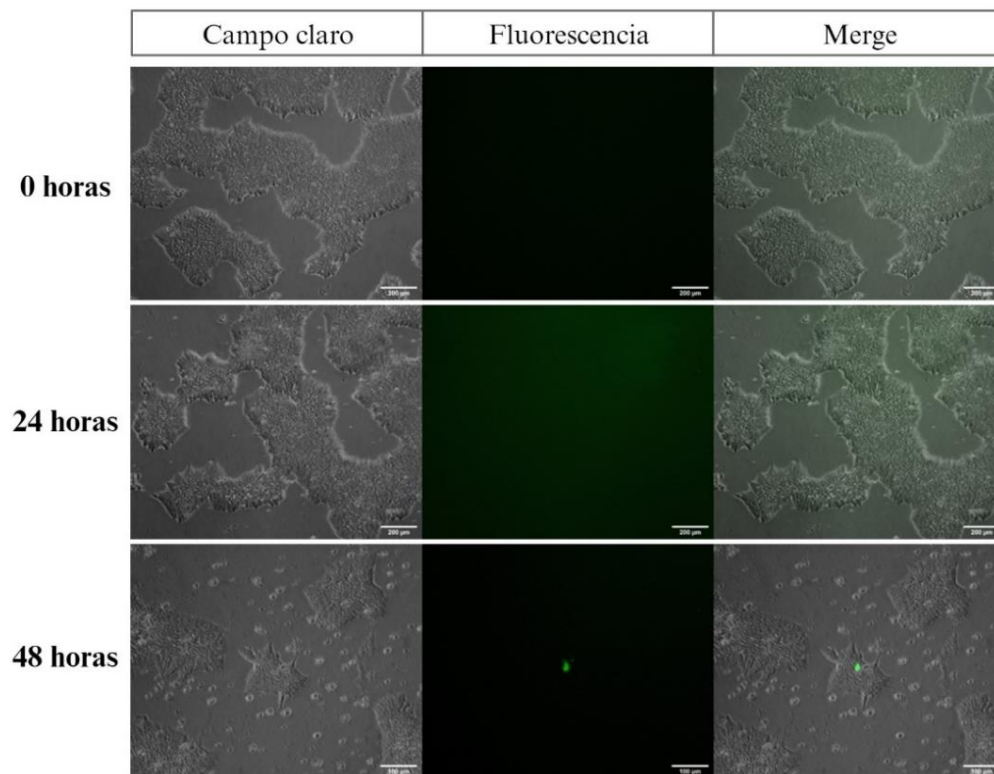
7.3 Expresión temporal de GFP inducida por doxyciclina.

Se realizó la transfección de los vectores para la integración dirigida del rtTA en las hESC-H9 en conjunto con el vector que expresa GFP bajo el TetO y que es inducible por doxyciclina (condición 3), esperando detectar células GFP positivas después del tratamiento con el antibiótico. Para ello, se agregó 1 $\mu\text{g/ml}$ de Dox a dicha condición en el día 5 post transfección (como muestra el esquema, **figura 10A**) y se evaluó la fluorescencia después del tratamiento. No se observaron células que expresaran GFP a las 24 horas después, sin embargo, se pudo detectar la fluorescencia una célula a las 48 horas (**figura 10B**). Aunque la señal coincide con los bordes de una célula en la imagen de campo claro, no es posible confirmar con certeza que se deba a la expresión inducible de GFP por doxyciclina considerando la eficiencia de transfección aun sin la integración específica. La fluorescencia, no obstante, dejó de detectarse al tercer día. Debido a que muchas células murieron con el tratamiento de ambos antibióticos, se retiró Dox al día siguiente y se continuó solamente con la selección con G418.

A)



B)



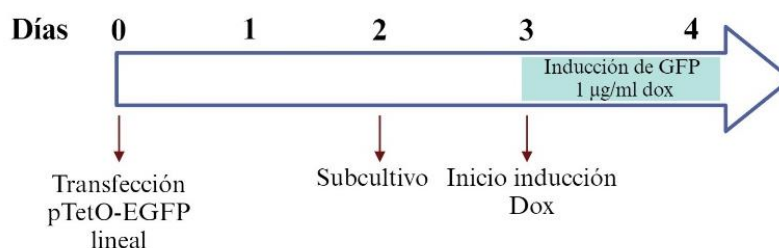
10. **Figura 10.** Inducción transitoria de la expresión de GFP por doxiciclina.

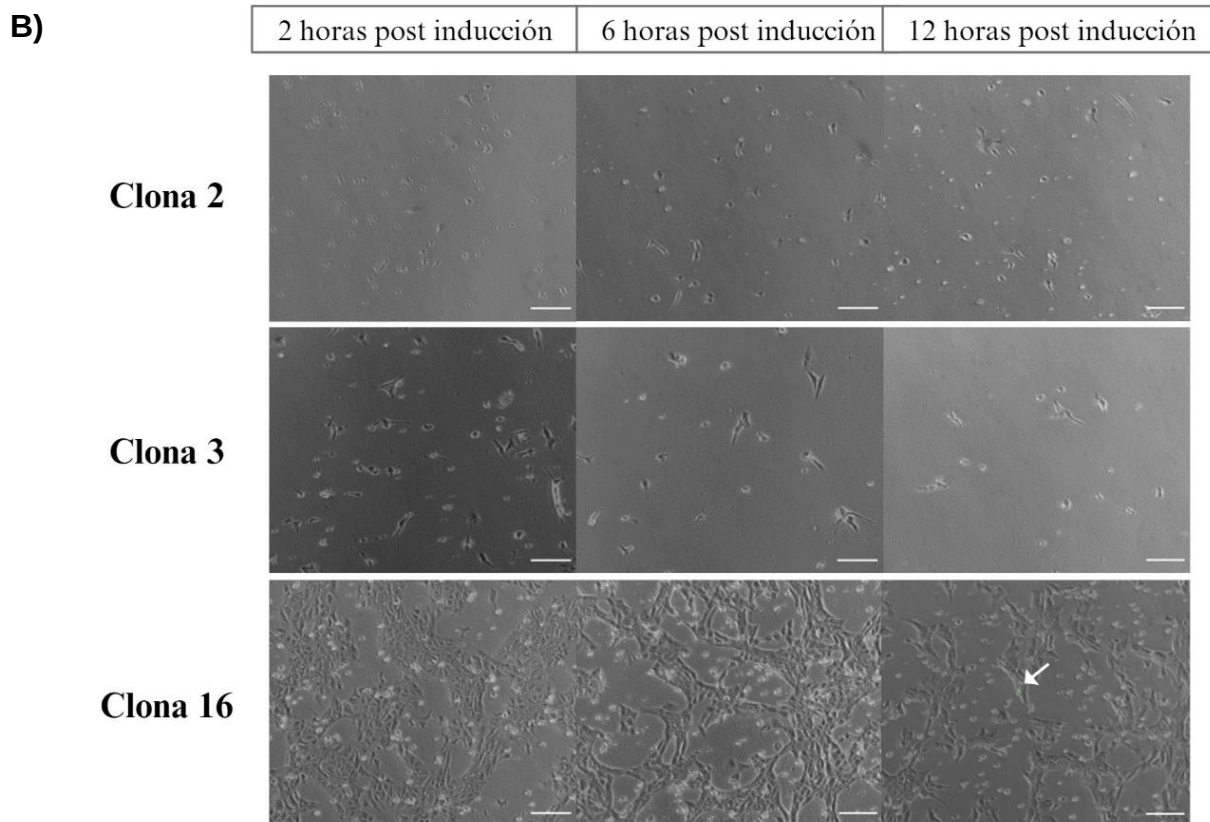
A) Esquema temporal donde se indica el inicio de la inducción con Dox, que fue simultáneo a la selección con G418. **B)** Mínima expresión de GFP a las 48 horas post inducción. Barra de escala 200 µm.

7.4 Transfección de TetO-EGFP y expresión de GFP inducible por doxiciclina.

Las clonas positivas 2, 3 y 6, así como la clona 16 fueron descongeladas y expandidas para posteriormente ser transfectadas con el vector que expresa la proteína reportera GFP bajo el promotor tetO. No obstante, la clona 6 contenía solamente células con una morfología distinta a la típica para hESC, la cual se asoció con células diferenciadas y no fue posible rescatarlas. Por ello, se continuó trabajando con las clonas restantes. Se transfectó el plásmido pTetO-EGFP linealizado previamente, ya que se buscaba la ulterior integración del vector en el genoma, aunque fuese de manera aleatoria, y se indujo la expresión de GFP al día 3 post transfección con 1 $\mu\text{g/ml}$ de Dox, como se indica en la línea temporal de la **figura 11A**. Al rastrear la expresión de GFP, no se detectó fluorescencia de las células en ninguna clona a las 2 ni a las 6 horas después de la inducción, pero se observó una célula GFP positiva a las 24 horas en la clona 16 (**figura 11B**).

A)





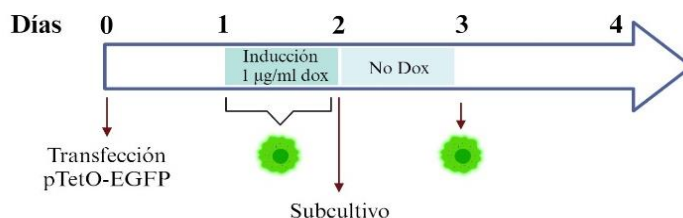
11. **Figura 11.** Inducción de la expresión de GFP por doxyciclina en clonas seleccionadas.

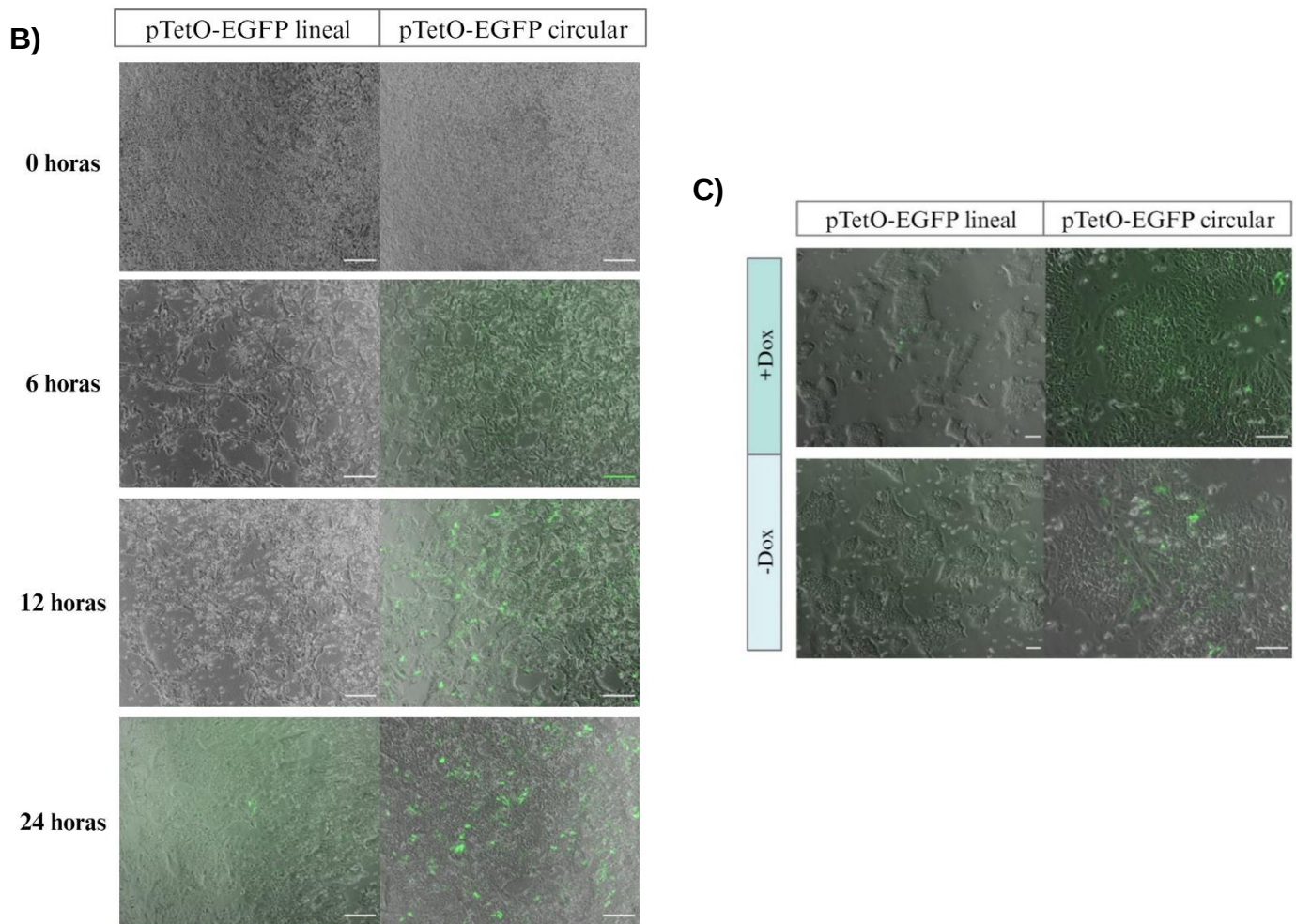
A) Línea temporal donde se especifica la transfección del plásmido lineal y el inicio de la inducción. **B)** Sólo pudo observarse una pequeña señal de fluorescencia a las 12 horas en la clona 16 (flecha). Barra de escala 200 μ m.

Con los resultados obtenidos, no era posible determinar con certeza si la escasez de fluorescencia se debía a un defecto en el sistema de expresión inducible, como la falta de expresión del rtTA, o si el plásmido tetO-EGFP se había diluido lo suficiente como para impedir la inducción de la expresión de GFP en las células. Por esta razón, se realizó una nueva transfección de tetO-EGFP, utilizando tanto su forma lineal como circular, con el fin de aumentar la expresión del transgén, tal como se ha reportado en estudios previos. (Tabar et al., 2015). Además, se decidió inducir la expresión de GFP a las 24 horas post transfección con la intención de que las células tuviesen la mayor concentración posible del plásmido tetO-EGFP en el momento de la inducción con doxyciclina. Las hESC-H9 de la clona 16, aquella en la que se detectó una pequeña señal de fluorescencia, fueron tratadas con 1 μ g/ml

de doxíciclina al día 1 post transfección y se rastrearon las células GFP positivas a las 0, 6, 12 y 24 horas como muestra el esquema de la **figura 12A**. No se detectaron células fluorescentes transfectadas con el plásmido lineal en las primeras 12 horas, sin embargo, a las 24 horas se observaron algunas GFP positivas (**figura 12B, izquierda**). En cambio, en el caso del ptetO-EGFP circular, se observó la fluorescencia de las células desde las 6 horas post inducción, la cual aumentó a las 12 y se mantuvo a las 24 horas (**figura 12B, derecha**). Al realizar el subcultivo de las células en un área mayor como lo indica el protocolo de nucleofección (véase el apartado 10.6), cada condición de transfección se separó, a su vez, en dos más, de las cuales solamente una continuó con el tratamiento con doxíciclina. Después de 24 horas, se detectó la fluorescencia de las células con Dox en ambas condiciones de transfección, con el plásmido lineal y circular. No obstante, las hESC-H9-rtTA sin doxíciclina continuaron expresando GFP (**figura 12C**). En conjunto, esto demuestra que, en efecto, se lleva a cabo la unión del complejo rtTA-doxíciclina al Tet operador y se induce la expresión de GFP.

A)





12. **Figura 12.** Inducción de la expresión de GFP luego de transfección del plásmido lineal o circular.

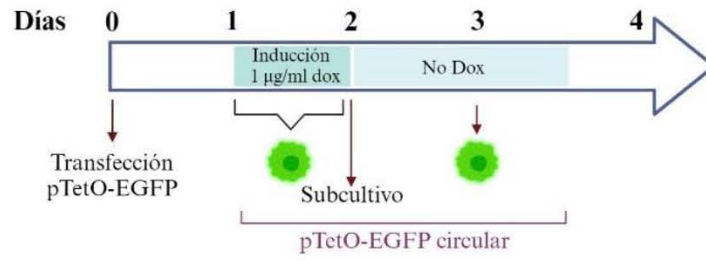
A) Línea temporal donde se especifica el momento de la transfección, la inducción con doxiciclina y su retiro. **B)** Expresión de GFP en clona 16 en distintos tiempos post inducción. La conformación del plásmido influye en la eficiencia de la inducción. Barra de escala 200 μm . **C)** Expresión de GFP en clona 16 después de retirar doxiciclina. Para ambas formas del plásmido, hay una expresión de fondo. Barra de escala 100 μm .

7.5 Evaluación del sistema TetOn para la expresión inducible y regulada de GFP.

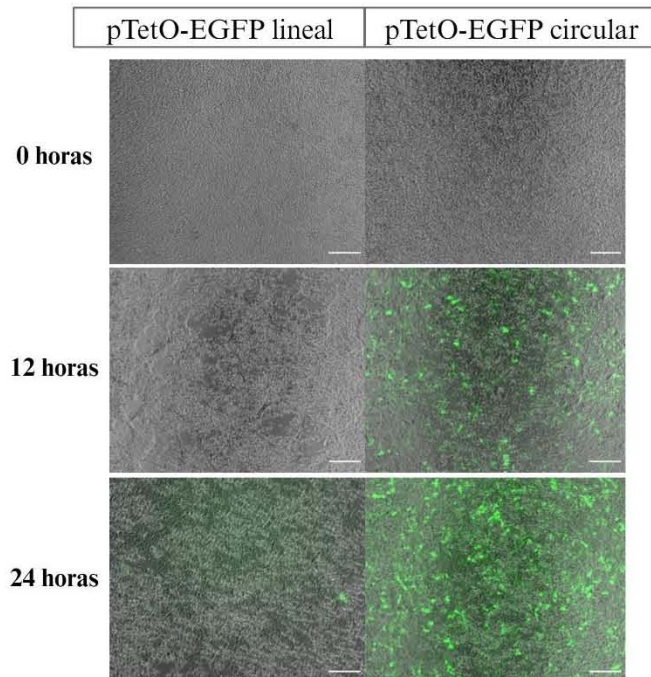
Con el objetivo de determinar la funcionalidad y eficiencia del sistema TetOn para regular la expresión de GFP, se realizó un último ensayo de trasfección. La clona 16 de hESC-H9-rtTA se nucleofectó con el plásmido tetO-EGFP lineal o circular, separando el total de ellas en dos condiciones desde antes de comenzar el

tratamiento con Dox. Al día siguiente de la transfección, sólo a uno de los pozos de cada condición de transfección se agregó doxiciclina. Como se observa en la **figura 13**, se detectó fluorescencia hasta las 24 horas después de la adición del antibiótico en las células transfectadas con la conformación lineal del plásmido (panel B). En cambio, pudo observarse células GFP positivas desde las 12 horas post inducción que habían sido transfectadas con el plásmido circular. Además, el número de células fluorescentes aumentó a las 24 horas (panel B). La proporción de células GFP positivas incrementó de un 34.9% luego de 12 horas a un 48.5% a las 24 horas post inducción (**figura 13D**). Una vez realizado el subcultivo de las células, después del cual se retiró la doxiciclina, se rastreó la fluorescencia a las 24 horas en todas las condiciones. Es importante recordar que las células son sembradas en un área mayor luego del subcultivo, por lo que pareciera que el número de ellas es drásticamente menor. Si bien aún se observaron algunas células GFP positivas en la condición con el tetO-EGFP circular, la cantidad fue menor respecto a las que habían estado en presencia de Dox por 24 horas, reduciendo su porcentaje a 13.4% (**figura 13D**). Esta fluorescencia disminuyó a 12% luego de las 36 horas. En contraste, no se detectaron células GFP positivas en la condición sin doxiciclina en ninguno de los tiempos evaluados (**figura 13C**). Para el caso de las células con el plásmido lineal, tampoco se detectó fluorescencia alguna después de retirar el antibiótico (datos no mostrados).

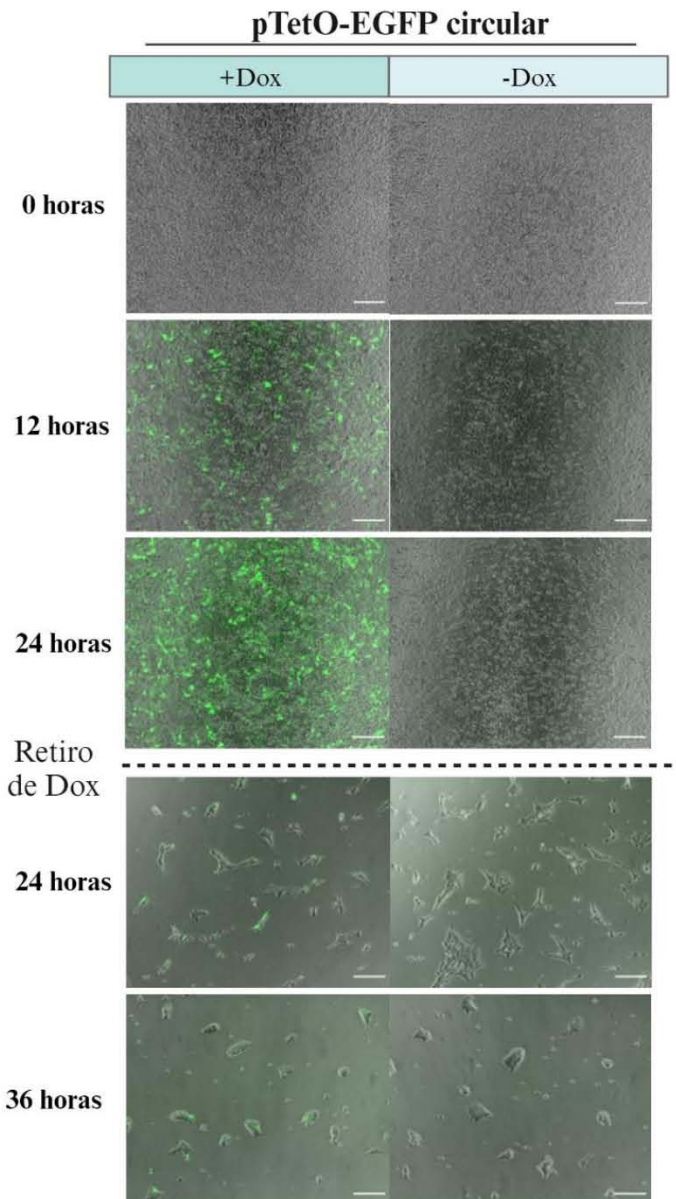
A)



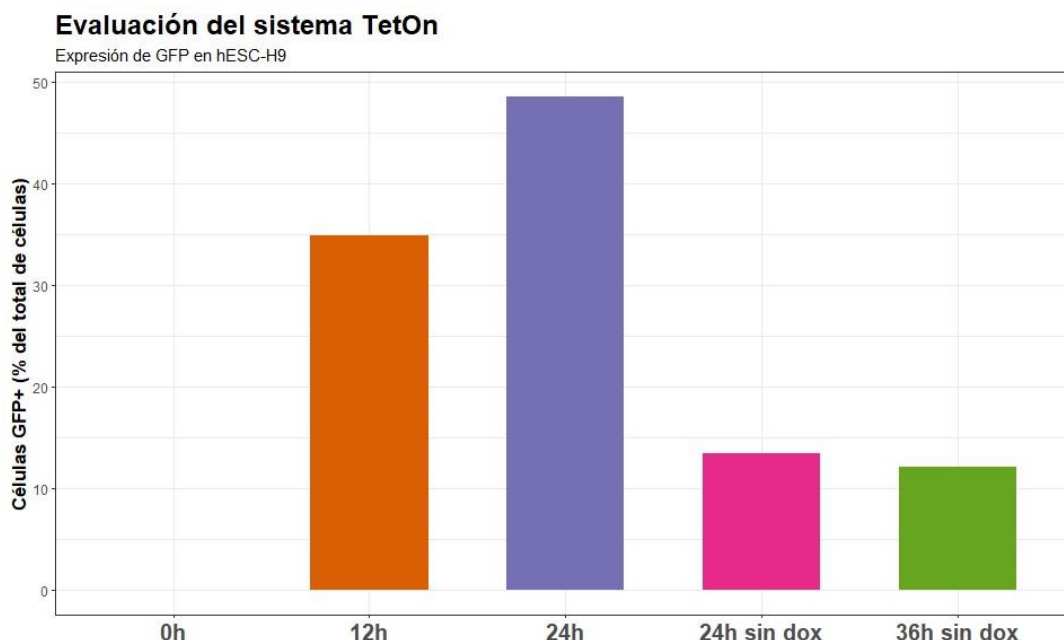
B)



C)



D)



13. **Figura 13.** Evaluación del sistema TetOn en hESC-H9-rtTA.

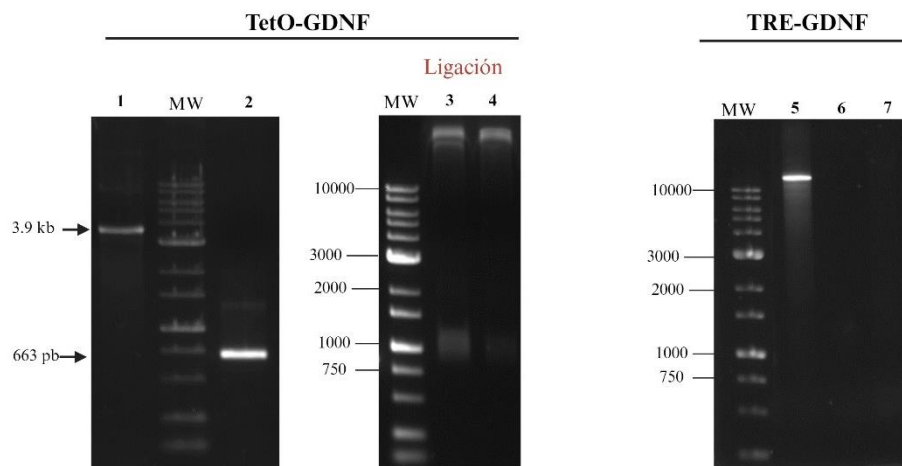
A) Línea temporal donde se especifica el momento de la transfección, la inducción con doxiciclina y su retiro. **B)** Expresión de GFP en la clona 16 a distintos tiempos post inducción. Barra de escala 200 μm . **C)** Expresión de GFP con o sin doxiciclina a lo largo del experimento, se especifica cuando se remueve el antibiótico. Barra de escala 200 μm . **D)** Proporción de células GFP+ respecto al total después de la inducción y luego de retirar la doxiciclina. La expresión de GFP disminuye en un 35%.

Aunque la expresión de GFP en las células persiste incluso después de 36 horas sin doxiciclina, el sistema de expresión inducible demuestra ser funcional. Esto se evidencia en la capacidad del rtTA-Dox para activar el promotor tetO y, a su vez, inducir la expresión del transgén, mientras que dicha expresión disminuye al retirar el antibiótico. Por lo tanto, este sistema es adecuado para regular la expresión de otras proteínas, como el GDNF. En este contexto, se busca desarrollar una línea estable de hESC con el sistema TetOn para controlar la expresión de este factor neurotrófico.

7.6 Construcción de los vectores TetO-GDNF y TRE-GDNF.

En un primer acercamiento, se pretendía obtener un vector con la secuencia codificante de GDNF bajo el control del operador Tet (tetO), con el objetivo de transfectarlo en las células hESC-H9-rtTA y establecer un sistema regulable para la expresión de GDNF. Para ello, se diseñaron dos estrategias de clonación. La primera consistió en la clonación mediante PCR y digestión de ambos, el producto amplificado y el vector, para su posterior ligación. Fue crucial añadir dos sitios de restricción diferentes al inicio y al final del fragmento amplificado para lograr una clonación direccionada. Después de cada digestión y purificación, se verificó el resultado mediante electroforesis. Los fragmentos digeridos, tanto del inserto como del vector, fueron identificados en el gel con tamaños de 663 pb y 3.9 kb, respectivamente (**figura 14A**), tal como se esperaba. Sin embargo, tras realizar la ligación, no se observó crecimiento de colonias bacterianas, lo que indicó que la reacción de ligación no se llevó a cabo correctamente.

La segunda estrategia fue distinta, puesto que implicó la clonación por digestión y ligación del inserto de interés al plásmido pPB Booster/rtTA. Este plásmido contiene sitios de reconocimiento para una transposasa hiperactiva, lo que permite la integración de la construcción en el genoma tras la co-transfección del TRE-GDNF y el vector de expresión de la transposasa (pCAG-hypBase) en las hESC-H9. La ventaja de este método es que permite obtener un vector (TRE-GDNF) con ambos elementos del sistema TetOn: el GDNF bajo TetO y el rtTA bajo un promotor constitutivo. A pesar de realizar la ligación del inserto y el vector, no se observaron colonias bacterianas en las placas de agar ni productos de ligación (**figura 14B**).



14. **Figura 14.** Seguimiento de la construcción de TetO-GDNF y TRE-GDNF.

A la izquierda, el vector (1) e inserto (2) antes de la ligación y, en medio, los productos de ligación de TetO-GDNF en proporción 1:3 (carril 3) y 1:5 (carril 4). A la derecha, el vector digerido (carril 5), inserto (carril 6) y producto de la ligación entre ellos (carril 7) para la construcción del TRE-GDNF. Se especifican las longitudes de algunas bandas del marcador de peso molecular (MW).

VIII. DISCUSIÓN.

El presente trabajo describe el proceso para generar hESC de la línea H9 que sean capaces de expresar la proteína reportera GFP de manera inducible mediante el sistema TetOn, el cual utiliza el tratamiento con doxiciclina para inducir dicha expresión. Se demostró que las hESC-H9-rtTA son estables y expresan constitutivamente el transactivador reverso, el cual es capaz de inducir la expresión gradual de GFP desde las 12 horas con la adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina. La ventaja de este sistema es que, a diferencia del TetOff, la transcripción del transgén se consigue solamente en la presencia de doxiciclina, permitiendo regular su expresión en ventanas de tiempo cortas, por ejemplo, en distintas etapas de la diferenciación dopaminérgica *in vitro*. De lo contrario, las hESC tendrían que exponerse a doxiciclina de manera prolongada, lo que pudiera conducir a efectos citotóxicos y alteraciones metabólicas o en la proliferación (Ahler et al., 2013; Das et al., 2016; Moullan et al., 2015).

Para obtener clonas de hESC-H9-rtTA, se transfectaron las células por nucleofección con los vectores para su integración dirigida en el genoma mediante el sistema CRISPR-Cas9. Se han reportado distintos métodos de transfección de DNA exógeno en hESC, entre ellos, la transducción viral, la lipofección, la electroporación y la nucleofección (Cao et al., 2010). De éstas, la electroporación es la de mayor eficiencia a pesar de que la supervivencia celular es baja (Cao et al., 2019; Moore et al., 2010; Tabar et al., 2015). La proporción de células GFP+ después de transfectar un plásmido reportero por nucleofección confirmó que es más eficiente (50.14%) en comparación con la lipofección (8.89%). A pesar de sacrificar la supervivencia, es más probable obtener células resistentes al antibiótico después de la selección, como ocurrió con los ensayos.

Por otro lado, resulta relevante enfatizar la integración del rtTA de manera dirigida, ya que de esta forma se reduce la posibilidad del silenciamiento del transgén si se incorpora en sitios altamente compactados del genoma o de su integración en otro gen que altere el fenotipo celular (Giudice & Trounson, 2008). En particular, la integración específica en el *locus* AAVS1, ha mostrado gran eficacia y, de manera importante, resiste al silenciamiento del transgén (Smith et al., 2008), debido a que se ha demostrado que contiene elementos de regulación *insulators* que lo protegen del silenciamiento (Oceguera-Yanez et al., 2016). La presencia de sólo una banda de 1.2 kb después de la amplificación con los dos pares de *primers* evaluados, pudiera sugerir que, al menos quince del total de clonas obtenidas, integraron el transgén en el *locus* deseado y en ambos alelos. No obstante, es imperativo confirmar este hecho mediante southern blot con una sonda dirigida al interior del transgén, que revelaría la integración del vector donador en otros sitios del genoma. Asimismo, al secuenciar los amplificadores de la genotipificación, se detectarían aquellas clonas con integraciones o deleciones puntuales (*indels*) debido a la reparación del DNA por unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) (Jasin & Rothstein, 2013; Oceguera-Yanez et al., 2016). Aunque no se llevaron a cabo estos análisis adicionales, el hecho de que se haya detectado la expresión de GFP después de la adición de doxiciclina y que haya disminuido al

retirar el antibiótico, comprueba que el sistema funciona y que el rtTA se ha incorporado al genoma sin algún evento que haya comprometido su integridad.

El tratamiento con doxiciclina simultáneo a la selección con G418 de las células transfectadas resultó en una pequeña señal de fluorescencia a las 48 horas. Esto pudiera indicar que la expresión de GFP fue inducida por la unión del rtTA-Dox al TetO, sin embargo, hasta este punto se desconoce si el rtTA se ha integrado al genoma o si está intacto como para expresarse correctamente y unirse a doxiciclina. De cualquier manera, resultó conveniente este ensayo para asegurar la dirección adecuada de la estrategia experimental, dadas las complicaciones para obtener hESC-H9 resistentes después de la selección (datos no mostrados).

Una vez integrado el rtTA en las células e inducir la expresión de GFP luego de la transfección con pTetO-EGFP lineal, no se observaron células fluorescentes. En cambio, la expresión de GFP fue rastreada desde las 6 horas post inducción cuando se transfectaban con el plásmido en su forma circular, indicando que la conformación del plásmido interviene en la eficiencia de la transfección e, indirectamente, del sistema TetOn. Esto coincide con otros estudios donde se ha reportado que la eficiencia es mayor al transfectar, por dos métodos distintos, un plásmido en su conformación circular en comparación con el lineal (Lehner et al., 2013). Una posible explicación de este fenómeno es que el vector conserva una expresión episomal. Sin embargo, a pesar de que presenta gran expresión transitoria al inicio, su tasa de integración (aleatoria) al genoma de células humanas es menor respecto a la forma lineal (Lim et al., 2023; Tabar et al., 2015). La nucleofección del pTetO-EGFP circular fue útil para demostrar la funcionalidad del sistema TetOn, pero se deberá trabajar con su forma lineal para generar líneas H9-TetO-GFP estables.

Una observación relevante fue la fluorescencia de las células aún después de 36 horas de haber retirado la doxiciclina. La causa más probable es una fuga del sistema TetOn, debido a la cual continúa la expresión del transgén incluso en ausencia del inductor. Esta “expresión de fondo” se debe a características intrínsecas del sistema, relacionadas con la actividad del operador Tet

independiente del rtTA, que puede deberse a la interacción de otros factores transcripcionales con el promotor o por la unión residual del rtTA al tetO en ausencia de Dox (Das et al., 2016). La primera de estas causas puede ser descartada ya que no se observó fluorescencia alguna en las células sin doxiciclina durante los tiempos evaluados, es decir, al parecer no existe actividad de factores transcripcionales distintos en el tetO que pudieran inducir la expresión de GFP ante la falta de Dox. La segunda alternativa es más probable dado que, desde el desarrollo del sistema TetOn, el rtTA ha presentado diversos inconvenientes, entre los cuales destaca la afinidad residual baja pero distintiva hacia tetO y la concomitante actividad “de fondo” intrínseca en el estado no inducido (Baron et al., 1997; A. Das et al., 2016; Urlinger et al., 2000). Particularmente, la variante del rtTA utilizada en este trabajo (rtTA-M2) fue generada por Urlinger y colaboradores mediante mutagénesis dirigida para enfrentar estas desventajas. Ellos reportaron que dicha variante poseía una baja expresión de fondo y una mayor sensibilidad a Dox que la variante anterior (rtTA-M1), además de haber adquirido mayor potencial de activación para el promotor original del operón en *E. coli* (Urlinger et al., 2000). No obstante, también desarrollaron dos variantes más (con modificaciones posteriores), que difieren del rtTA-M2 por su sensibilidad a Dox. Estas nuevas variantes son inducidas por completo con concentraciones de Dox diez veces menores.

Si bien la sensibilidad del rtTA hacia Dox es una variable importante que considerar, en este estudio fue secundaria, dado que la concentración evaluada fue suficiente para inducir la expresión de GFP. No obstante, dicha sensibilidad podría explicar la expresión de fondo observada. Después de retirar la doxiciclina del medio de cultivo, su concentración intracelular sigue siendo lo suficientemente alta para que continúe la interacción rtTA-Dox y se promueva la expresión del transgén; aunque esto debe ser comprobado mediante la evaluación de concentraciones menores de Dox (no evaluado). La expresión de fondo de la variante del rtTA utilizada en este trabajo concuerda con lo reportado por Das y colaboradores, quienes mostraron que ésta y otra variante tiene menor sensibilidad e inducibilidad a Dox que la variante rtTA-V16 (Das et al., 2016). En dicho estudio se evaluaron las tres variantes con distintas concentraciones de doxiciclina y se demostró que inducen la expresión del transgén

-en proporciones bajas- incluso después de 6 días sin el inductor y, además, la expresión de fondo varía dependiendo del tipo celular. Este y otros estudios donde reportan la expresión de fondo mínimo a las 48 horas después retirar Dox (Akhtar et al., 2018; Fu et al., 2008), comprueban que el sistema establecido en las hESC-H9 es similar a lo conseguido anteriormente y, por tanto, funciona para la expresión regulada de GFP y podría usarse para la del GDNF.

Una vez establecido el sistema TetOn para la expresión inducible del GDNF, se pretende inducir la expresión de este factor neurotrófico a lo largo de la diferenciación dopaminérgica (Kriks et al., 2011) y determinar su efecto en este proceso, así como establecer la etapa en que dicho efecto es mayor. Cabe mencionar, sin embargo, que debe optimizarse (es decir, disminuir) la dosis de Dox en lo posible para evitar efectos adversos en las hESC. Se sabe que la familia de tetraciclinas, incluida la doxiciclina, afectan el balance en la expresión proteica nuclear y mitocondrial de células eucariotas, disminuye la respiración celular e interviene en la función mitocondrial (Moullan et al., 2015). Además, se ha reportado que en hESC o iPSC con el sistema TetOn, la doxiciclina por sí sola promueve drásticamente la diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas y no así el gen inducible estudiado (Cao et al., 2019). Este efecto de “enmascaramiento” de Dox es dependiente de la dosis, por lo que es fundamental reducir la exposición de las hESC a Dox tanto en concentración como en tiempo. Posteriormente, podría evaluarse la supervivencia de las DaN diferenciadas después de su trasplante a ratas hemoparkinsonianas y establecer una diferencia no sólo en el número de DaN, sino también en su integración dentro del tejido hospedero y el tiempo o eficiencia del mejoramiento de los síntomas motores (Gantner et al., 2020; Lara-Rodarte et al., 2021; Tereshchenko et al., 2014).

La construcción del vector TetO-GDNF, por otro lado, fue un objetivo no cubierto a pesar de que se utilizó una estrategia de clonación conveniente, dada la direccionalidad del inserto para la ligación, además de la generación de extremos cohesivos, los cuales conducen a una mayor eficiencia de ligación (Sambroock & Russell, 2001). La ausencia de colonias bacterianas en la placa de agar está

directamente relacionada con una falla en la ligación, que pudiera ser causada por una proporción molar inserto:vector insuficiente o incorrecta. La cuantificación tanto del vector como del inserto fue poco precisa dada la cantidad limitada de muestra recuperada después de cada etapa. Asimismo, no puede descartarse la posible existencia de impurezas en las muestras dados los múltiples ciclos de purificación a los que fueron sometidos en cada etapa del proceso. No se puede atribuir, sin embargo, a alguna alteración en la secuencia del plásmido molde, ya que su secuenciación confirmó la integridad de éste, así como la de la secuencia codificante para GDNF (Anexo 2).

La estrategia alternativa para obtener hESC que expresen GDNF de manera inducible pretendía utilizar la integración aleatoria al genoma mediante la acción de una transposasa hiperactiva. Como se mencionó anteriormente, el silenciamiento del transgén, la alteración del fenotipo por inserción en otro gen y la integración de múltiples copias del vector son los principales riesgos de este sistema (Giudice & Trounson, 2008; Smith et al., 2008), pero consideramos que representaba una segunda opción conveniente. No obstante, la construcción del TRE-GDNF implicaba otras desventajas; uno de los extremos generados en el vector era romo y la eficiencia de recuperación del DNA luego de la extracción fue baja, por lo que no fue posible aumentar la proporción molar vector:inserto mayor a 1:3. Por ello, tampoco se tuvo éxito en la reacción de ligación. Este problema, sin embargo, puede ser solucionado utilizando otras estrategias de clonación que se han desarrollado debido a los inconvenientes usuales de la clonación molecular clásica (Sun et al., 2023), entre ellos, el método de Golden Gate (Engler & Marillonnet, 2014) o Flexi Vector System (Promega). Estos métodos facilitarían la obtención del vector TetO-GDNF para la transfección en las hESC-H9-rtTA generadas en este trabajo. Cabe mencionar, además, que otra manera de abordar el establecimiento de una línea de hESC con el sistema TetOn para GDNF, es la construcción de un solo vector en el que se contenga tanto el rtTA como el TetO-GDNF, de tal manera que se deba realizar sólo una transfección. Esta aproximación evitaría problemas como la integración aleatoria del vector, los eventos genéticos desconocidos después de la transfección y la excesiva manipulación de las células.

En resumen, este trabajo demostró la transgénesis exitosa de células hESC-H9 para la expresión del activador transcripcional regulado por tetraciclina de manera constitutiva y cuya integración fue dirigida mediante CRISPR-Cas9. Asimismo, se mostró que 1 µg/ml de doxiciclina es suficiente para inducir la expresión gradual de GFP en casi el 50% de las células, además de que disminuye considerablemente después de retirar el inductor. A pesar de no desaparecer completamente, la expresión de fondo observada concuerda con lo antes reportado en la evaluación del sistema TetOn en líneas de células troncales pluripotenciales. Si bien se conocen (y se describieron) las limitaciones de este trabajo, consideramos que la potencial aplicación para regular la expresión del GDNF y evaluarla en la diferenciación dopaminérgica para su posterior trasplante en modelos preclínicos de la PD, es suficientemente beneficiosa.

IX. CONCLUSIONES.

La transfección por nucleofección y la selección con 150 µg/ml del antibiótico G418 son las condiciones óptimas para obtener hESC-H9 que hayan integrado el transgén evaluado.

La nucleofección es un método de transfección más eficiente en hESC-H9 en comparación con la lipofección (50% y 7% respectivamente), a pesar de la poca supervivencia de las células.

De acuerdo con la genotipificación, 4 clonas estables integraron el transgén del rtTA en el *locus* AAVS1.

La expresión de GFP se induce con 1 µg/ml de doxiciclina después de 12 horas y aumenta a las 24 horas. Además, dicha expresión disminuye considerablemente después de 36 horas de retirar el antibiótico.

El sistema TetOn es funcional y puede ser utilizado para regular la expresión de la proteína reportera GFP.

X. PERSPECTIVAS.

Genotipificar la región de la secuencia de homología a la derecha del *locus* AAVS1. Adicionalmente, secuenciar el transgén integrado para identificar posibles *indels*.

Evaluar el sistema TetOn en las clonas positivas 2, 3 y 5 y a tiempos más prolongados.

Generar una clona transgénica estable de hESC-H9 con el sistema TetOn.

Identificar clonas heterocigotas que sean potenciales blancos para una segunda transfección.

Obtener el vector tetO-GDNF entre las secuencias de homología al *locus* AAVS1 para transfectarlo en las clonas positivas y heterocigotas.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Adler, A. F., Cardoso, T., Nolbrant, S., Mattsson, B., Hoban, D. B., Jarl, U., Wahlestedt, J. N., Grealish, S., Björklund, A., & Parmar, M. (2019). hESC-Derived Dopaminergic Transplants Integrate into Basal Ganglia Circuitry in a Preclinical Model of Parkinson's Disease. *Cell Reports*, 28(13), 3462-3473.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.058>
- Ahler, E., Sullivan, W. J., Cass, A., Braas, D., York, A. G., Bensinger, S. J., Graeber, T. G., & Christofk, H. R. (2013). Doxycycline Alters Metabolism and Proliferation of Human Cell Lines. *PLoS ONE*, 8(5), 8–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064561>
- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience* 2002 3:5, 3(5), 383–394. <https://doi.org/10.1038/nrn812>
- Akhtar, A. A., Gowing, G., Kobritz, N., Savinoff, S. E., Garcia, L., Saxon, D., Cho, N., Kim, G., Tom, C. M., Park, H., Lawless, G., Shelley, B. C., Mattis, V. B., Breunig, J. J., & Svendsen, C. N. (2018). Inducible Expression of GDNF in Transplanted iPSC-Derived Neural Progenitor Cells. *Stem Cell Reports*, 10(6), 1696–1704. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.024>

- Altmann, C. R., & Brivanlou, A. H. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *International Review of Cytology*, 203, 447–482. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(01\)03013-3](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(01)03013-3)
- Amano, T., Papanikolaou, T., Sung, L. Y., Lenington, J., Conover, J., & Yang, X. (2009). Nuclear transfer embryonic stem cells provide an in vitro culture model for parkinson's disease. *Cloning and Stem Cells*, 11(1), 77–87. <https://doi.org/10.1089/clo.2008.0059>
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., & Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction*, 70(3), 837–845. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021147>
- Andrews, P. W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357(1420), 405–417. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2002.1058>
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. In *The Lancet Neurology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 1257–1272). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
- Baker, W. L., Silver, D., White, C. M., Kluger, J., Aberle, J., Patel, A. A., & Coleman, C. I. (2009). Dopamine agonists in the treatment of early Parkinson's disease: A meta-analysis. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(4), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.07.004>
- Baron, U., Gossen, M., & Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Research*, 25(14), 2723–2729. <https://doi.org/10.1093/nar/25.14.2723>
- Barroso-Chinea, P., Cruz-Muros, I., Afonso-Oramas, D., Castro-Hernández, J., Salas-Hernández, J., Chtarto, A., Luis-Ravelo, D., Humbert-Claude, M., Tenenbaum, L., & González-Hernández, T. (2016). Long-term controlled GDNF over-expression reduces dopamine transporter activity without affecting tyrosine hydroxylase expression in the rat mesostriatal system. *Neurobiology of Disease*, 88, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.002>
- Billinton, N., & Knight, A. W. (2001). Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 291, Issue 2, pp. 175–197). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.5006>
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson's disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10291, pp. 2284–2303). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)

- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.08.020>
- Braam, S. R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., van den Brink, S., van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., Sonnenberg, A., & Mummery, C. L. (2008). Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via $\alpha\text{V}\beta 5$ Integrin. *Stem Cells*, 26(9), 2257–2265. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0291>
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva De Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., & Vallier, L. (2007a). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007 448:7150, 448(7150), 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature05950>
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva De Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., & Vallier, L. (2007b). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature05950>
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380(6569), 64–66. <https://doi.org/10.1038/380064a0>
- Cao, D., Cheung, H. H., & Chan, W. Y. (2019). Doxycycline Masks the Genuine Effect of the Doxycycline-Inducible Transgene by Promoting Dopaminergic Neuron Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 28(13), 833–845. https://doi.org/10.1089/SCD.2018.0209/SUPPL_FILE/SUPP_FIG4.PDF
- Cao, F., Xie, X., Gollan, T., Zhao, L., Narsinh, K., Lee, R. J., & Wu, J. C. (2010). Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Molecular Imaging and Biology*, 12(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/S11307-009-0236-X>
- Cardoso, T., Adler, A. F., Mattsson, B., Hoban, D. B., Nolbrant, S., Wahlestedt, J. N., Kirkeby, A., Grealish, S., Björklund, A., & Parmar, M. (2018). Target-specific forebrain projections and appropriate synaptic inputs of hESC-derived dopamine neurons grafted to the midbrain of parkinsonian rats. *Journal of Comparative Neurology*, 526(13), 2133–2146. <https://doi.org/10.1002/cne.24500>

- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., & Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Developmental Cell*, 10(5), 615–624. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2006.02.020>
- Chtarto, A., Humbert-Claude, M., Bockstael, O., Das, A. T., Boutry, S., Breger, L. S., Klaver, B., Melas, C., Barroso-Chinea, P., Gonzalez-Hernandez, T., Muller, R. N., DeWitte, O., Levivier, M., Lundberg, C., Berkhout, B., & Tenenbaum, L. (2016). A regulatable AAV vector mediating GDNF biological effects at clinically-approved sub-antimicrobial doxycycline doses. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3, 16027. <https://doi.org/10.1038/MTM.2016.27>
- Chtarto, A., Yang, X., Bockstael, O., Melas, C., Blum, D., Lehtonen, E., Abeloos, L., Jaspar, J. M., Levivier, M., Brothi, J., Velu, T., & Tenenbaum, L. (2007). Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector. *Experimental Neurology*, 204(1), 387–399. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.11.014>
- Collier, T. J., Sortwell, C. E., & 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. *Journal of Neuroscience*, 19(13), 5563–5573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-13-05563.1999>
- Conway, J. A., Ince, S., Black, S., & Kramer, E. R. (2020). GDNF/RET signaling in dopamine neurons in vivo. *Cell and Tissue Research*, 382, 135–146. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03268-9/Published>
- Cortés, D., Carballo-Molina, O. A., Castellanos-Montiel, M. J., & Velasco, I. (2017). The non-survival effects of Glial cell line-derived neurotrophic factor on neural cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 258. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00258/BIBTEX>
- Covarrubias, L., Martínez-Sarmiento, J. Á., Valencia, C., Nagy, A., & Hernández-García, D. (2021). The levels of reprogramming factors influence the induction and maintenance of pluripotency: the case of CD1 mouse strain cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 65(4-5-6), 365–376. <https://doi.org/10.1387/IJDB.200233LC>
- Das, A. T., Zhou, X., Metz, S. W., Vink, M. A., & Berkhout, B. (2016). Selecting the optimal Tet-On system for doxycycline-inducible gene expression in transiently transfected and stably transduced mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 11(1), 71–79. <https://doi.org/10.1002/biot.201500236>
- Das, A., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, 16(3), 156–167. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041>

- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889–909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. *Genes*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/genes12071006>
- di Santo, S., & Widmer, H. (2018). Neurotrophic factor-based strategies to enhance survival and differentiation of neural progenitor cells toward the dopaminergic phenotype. *Brain Circulation*, 4(3), 139. https://doi.org/10.4103/bc.bc_23_18
- Dovonou, A., Bolduc, C., Soto Linan, V., Gora, C., Peralta, M. R., & Lévesque, M. (2023). Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Translational Neurodegeneration*, 12(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00368-8>
- Eguizabal, C., Aran, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Geens, M., Heindryckx, B., Panula, S., Popovic, M., Vassena, R., & Veiga, A. (2019). Two decades of embryonic stem cells: a historical overview. *Human Reproduction Open*, 2019(1), hoy024–hoy024. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy024>
- Ehgoetz Martens, K. A., & Shine, J. M. (2018). The interactions between non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 18(6), 457–460. <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1472578>
- El-Kadiry, A. E. H., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Frontiers in Medicine*, 8(November), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.756029>
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). DNA cloning and assembly methods. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1116). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24395361>
- Evans, J. R., & Barker, R. A. (2008). Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(4), 437–447. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.4.437>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981 292:5819, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Fu, J.-D., Chan, C. W., & Li, R. A. (2008). An inducible transgene expression system for regulated phenotypic modification of human embryonic stem cells. *Cell Research*, 18(S1), S133–S133. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.223>
- Gantner, C. W., de Luzy, I. R., Kauhausen, J. A., Moriarty, N., Niclis, J. C., Bye, C. R., Penna, V., Hunt, C. P. J., Ermine, C. M., Pouton, C. W., Kirik, D., Thompson, L. H., & Parish, C. L. (2020). Viral Delivery of GDNF Promotes Functional

Integration of Human Stem Cell Grafts in Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*, 26(4), 511-526.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.010>

- Georgievska, B., Kirik, D., & 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. *Experimental Neurology*, 177(2), 461–474. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8006>
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental Biology* (R. Meyers, C. Wigg, Carroll Sydney, & K. Lafferty, Eds.; 11th ed.). Sinauer Associates, Inc. <http://labs.devbio.com>
- Gill, S. S., Patel, N. K., Hotton, G. R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., Brooks, D. J., Svendsen, C. N., & Heywood, P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line–derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine* 2003 9:5, 9(5), 589–595. <https://doi.org/10.1038/nm850>
- Giudice, A., & Trounson, A. (2008). Genetic Modification of Human Embryonic Stem Cells for Derivation of Target Cells. *Cell Stem Cell*, 2(5), 422–433. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.04.003>
- Gordon, S. L., Quinsey, N. S., Dunkley, P. R., & Dickson, P. W. (2008). Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1614–1623. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05509.X>
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hiller, W., & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, 1766–1769.
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Björklund, A., & Parmar, M. (2014). Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 15(5), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>
- Groiss, S. J., Wojtecki, L., Sudmeyer, M., & Schnitzler, A. (2009). Deep brain stimulation in Parkinson-s disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2(6), 379–391. <https://doi.org/10.1177/1756285609339382>
- Guo, J., Ma, D., Huang, R., Ming, J., Ye, M., Kee, K., Xie, Z., & Na, J. (2017). An inducible CRISPR-ON system for controllable gene activation in human pluripotent stem cells. *Protein and Cell*, 8(5), 379–393. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0360-8>

- Hackett, J. A., & Azim Surani, M. (2014). Regulatory principles of pluripotency: From the ground state up. In *Cell Stem Cell* (Vol. 15, Issue 4, pp. 416–430). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.015>
- Harris, J. P., Burrell, J. C., Struzyna, L. A., Chen, H. I., Serruya, M. D., Wolf, J. A., Duda, J. E., & Cullen, D. K. (2020). Emerging regenerative medicine and tissue engineering strategies for Parkinson's disease. In *npj Parkinson's Disease* (Vol. 6, Issue 1, pp. 1–14). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0105-5>
- Hoang, D. M., Pham, P. T., Bach, T. Q., Ngo, A. T. L., Nguyen, Q. T., Phan, T. T. K., Nguyen, G. H., Le, P. T. T., Hoang, V. T., Forsyth, N. R., Heke, M., & Nguyen, L. T. (2022). Stem cell-based therapy for human diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>
- Ibáñez, C. F., & Andressoo, J. O. (2017). Biology of GDNF and its receptors — Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiology of Disease*, 97(2017), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.021>
- Jasin, M., & Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>
- Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. (1981). The Foundation of Two Distinct Cell Lineages within the Mouse Morula. In *Cell* (Vol. 24).
- Kallunki, T., Barisic, M., Jäättelä, M., & Liu, B. (2019). How to choose the right inducible gene expression system for Mammalian studies? *Cells*, 8(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells8080796>
- Katolikova, N. V., Malashicheva, A. B., & Gainetdinov, R. R. (2020). Cell Replacement Therapy in Parkinson's Disease—History of Development and Prospects for Use in Clinical Practice. *Molecular Biology*, 54(6), 827–839. <https://doi.org/10.1134/S0026893320060060>
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D. A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., & Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Reports*, 1(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009>
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., & Martin, G. R. (1982). Isolation and Characterization of Type IV Procollagen, Laminin, and Heparan Sulfate Proteoglycan from the EHS Sarcoma. *Biochemistry*, 21(24), 6188–6193. <https://doi.org/10.1021/bi00267a025>

- Kramer, E. R., & Liss, B. (2015). GDNF-Ret signaling in midbrain dopaminergic neurons and its implication for Parkinson disease. *FEBS Letters*, 589(24 Pt A), 3760–3772. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.11.006>
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V., & Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011 480:7378, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
- Laitinen, L. V., Bergenheim, A. T., & Hariz, M. I. (1992). Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurosurgery*, 76(1), 53–61. <https://doi.org/10.3171/jns.1992.76.1.0053>
- Lang, A. E., Gill, S., Patel, N. K., Lozano, A., Nutt, J. G., Penn, R., Brooks, D. J., Hotton, G., Moro, E., Heywood, P., Brodsky, M. A., Burchiel, K., Kelly, P., Dalvi, A., Scott, B., Stacy, M., Turner, D., Wooten, V. G. F., Elias, W. J., ... Traub, M. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 59(3), 459–466. <https://doi.org/10.1002/ana.20737>
- Lara-Rodarte, R., Cortés, D., Soriano, K., Carmona, F., Rocha, L., Estudillo, E., López-Ornelas, A., & Velasco, I. (2021). Mouse Embryonic Stem Cells Expressing GDNF Show Enhanced Dopaminergic Differentiation and Promote Behavioral Recovery After Grafting in Parkinsonian Rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1480. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.661656/BIBTEX>
- Lehner, R., Wang, X., & Hunziker, P. (2013). Plasmid linearization changes shape and efficiency of transfection complexes. *European Journal of Nanomedicine*, 5(4), 205–212. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2013-0028>
- Lim, S., Yocum, R. R., Silver, P. A., & Way, J. C. (2023). High spontaneous integration rates of end-modified linear DNAs upon mammalian cell transfection. *Scientific Reports*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33862-0>
- Lin, L. F. H., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. (1993). GDNF: A glial cell line - Derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260(5111), 1130–1132. <https://doi.org/10.1126/science.8493557>
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D., & Björklund, A. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247(4942), 574–577. <https://doi.org/10.1126/science.2105529>

- Littrell, O. M., Pomerleau, F., Huettl, P., Surgener, S., McGinty, J. F., Middaugh, L. D., Granholm, A. C., Gerhardt, G. A., & Boger, H. A. (2012). Enhanced dopamine transporter activity in middle-aged Gdnf heterozygous mice. *Neurobiology of Aging*, 33(2), 427.e1-427.e14. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.013>
- Loi, P., Iuso, D., Czernik, M., & Ogura, A. (2016). A New, Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer? *Trends in Biotechnology*, 34(10), 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.008>
- López-Ornelas, A., Escobedo-avila, I., Ramírez-García, G., Lara-Rodarte, R., Urrieta-Chávez, B., Barrios-García, T., Cáceres-Chávez, V. A., Flores-Ponce, X., Carmona, F., Reynso, A., Aguilar, C., Kerik, N., Rocha, L., Verdugo-Díaz, L., Treviño, V., Bargas, J., Ramos-Mejía, V., Fernández-Ruiz, J., Campos-Romo, A., & Velasco, I. (2023). Human Embryonic Stem Cell-Derived Immature Midbrain Dopaminergic Neurons Transplanted in Parkinsonian Monkeys. *Ce/SS*, 12, 1–25.
- Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A., & Thomson, J. A. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnology*, 24(2), 185–187. <https://doi.org/10.1038/nbt1177>
- Marín-Llera, J., & Chimal-Monroy, J. (2017). Conceptos básicos de la Biología de las Células Troncales. In M. A. Chávez-González, J. Chimal-Monroy, E. Flores-Figueroa, & M. Lamas (Eds.), *Células Troncales: Biología y aplicaciones en biomedicina* (Primera ed, p. 24). Editorial Porrúa.
- Moore, J. C., Atze, K., Yeung, P. L., Toro-Ramos, A. J., Camarillo, C., Thompson, K., Ricupero, C. L., Brenneman, M. A., Cohen, R. I., & Hart, R. P. (2010). Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(3), 23. <https://doi.org/10.1186/SCRT23>
- Moore, M. W., Kleint, R. D., Fariias, I., Sauert, H., Armaninit, M., Phillipst, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-moore, K., & Rosenthal, A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382(July), 76–79.
- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., & Takahashi, J. (2013). Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate. *Stem Cell Reports*, 1(4), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.08.007>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441, 1068–1074. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature04956>

- Moullan, N., Mouchiroud, L., Wang, X., Ryu, D., Williams, E. G., Mottis, A., Jovaisaite, V., Frochaux, M. V., Quiros, P. M., Deplancke, B., Houtkooper, R. H., & Auwerx, J. (2015). Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: A call for caution in biomedical research. *Cell Reports*, 10(10), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.034>
- Mwizerwa, O., Das, P., Nagy, N., Akbareian, S. E., Mably, J. D., & Goldstein, A. M. (2011). Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Developmental Dynamics*, 240(6), 1402–1411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22630>
- National Institute of Neurological Disorder and Stroke. (2019). *Parkinson's Disease Information Page | National Institute of Neurological Disorders and Stroke*. National Health Service. <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Parkinsons-Disease-Information-Page>
- Niakan, K. K., & Eggan, K. (2013). Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental Biology*, 375(1), 54–64. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2012.12.008>
- Nichols, J., & Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 4, Issue 8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008128>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., & Smith, A. (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9)
- Nutt, J. G., Burchiel, K. J., Comella, C. L., Jankovic, J., Lang, A. E., Laws, E. R. Jr., Lozano, A. M., Penn, R. D., Simpson, R. K. Jr., Stacy, M., & Wooten, G. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*, 60(1), 69–73.
- Oceguera-Yanez, F., Kim, S. Il, Matsumoto, T., Tan, G. W., Xiang, L., Hatani, T., Kondo, T., Ikeya, M., Yoshida, Y., Inoue, H., & Woltjen, K. (2016). Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods*, 101, 43–55. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2015.12.012>
- Olanow, C. W., & Stocchi, F. (2018). Levodopa: A new look at an old friend. In *Movement Disorders* (Vol. 33, Issue 6, pp. 859–866). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.27216>
- Ou, Z., Pan, J., Tang, S., Duan, D., Yu, D., Nong, H., & Wang, Z. (2021). Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of

- Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Frontiers in Public Health*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.776847>
- Piao, J., Zabierowski, S., Dubose, B. N., Hill, E. J., Navare, M., Claros, N., Rosen, S., Ramnarine, K., Horn, C., Fredrickson, C., Wong, K., Safford, B., Kriks, S., El Maarouf, A., Rutishauser, U., Henchcliffe, C., Wang, Y., Riviere, I., Mann, S., ... Tabar, V. (2021). Preclinical Efficacy and Safety of a Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain Dopamine Progenitor Product, MSK-DA01. *Cell Stem Cell*, 28(2), 217-229.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.01.004>
- Postuma, R. B., Berg, D., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Deuschl, G., Gasser, T., Goetz, C. G., Halliday, G., Joseph, L., Lang, A. E., Liepelt-Scarfone, I., Litvan, I., Marek, K., Oertel, W., Olanow, C. W., Poewe, W., & Stern, M. (2016). The new definition and diagnostic criteria of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 15(6), 546–548. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00116-2)
- Precious, S. V., Smith, G. A., Heuer, A., Jaeger, I., Lane, E. L., Dunnett, S. B., Li, M., Kelly, C. M., & Rosser, A. E. (2020). Dopaminergic Progenitors Derived From Epiblast Stem Cells Function Similarly to Primary VM-Derived Progenitors When Transplanted Into a Parkinson's Disease Model. *Frontiers in Neuroscience*, 14(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00312>
- Ray Dorsey, E., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C., Ansha, M. G., Brayne, C., Choi, J. Y. J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H. P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S. M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gupta, R., Hankey, G. J., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 17(11), 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Rosenblad, C., Georgievska, B., & Kirik, D. (2003). Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), 260–270. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02456.x>
- Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2022). Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Developmental Cell*, 57(2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.12.022>
- Saavedra, A., Baltazar, G., & Duarte, E. P. (2008). Driving GDNF expression: The green and the red traffic lights. *Progress in Neurobiology*, 86(3), 186–215. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.006>
- Saini, D., & Yamanaka, Y. (2018). Cell Polarity-Dependent Regulation of Cell Allocation and the First Lineage Specification in the Preimplantation Mouse Embryo. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.008>

- Sajadi, A., Bauer, M., Thöny, B., & Aebischer, P. (2005). Long-term glial cell line-derived neurotrophic factor overexpression in the intact nigrostriatal system in rats leads to a decrease of dopamine and increase of tetrahydrobiopterin production. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1482–1486. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03139.x>
- Sambroock, J., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In *Cold Spring Harbor Laboratory: Vol. I* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sariola, H., & Saarma, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *Journal of Cell Science*, 116(19), 3855–3862. <https://doi.org/10.1242/JCS.00786>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schwartz, P. H., & Wesselschmidt, R. L. (2011). Human Pluripotent Stem Cells Methods and protocols. In P. H. Schwartz & R. L. Wesselschmidt (Eds.), *Structure and Dynamics of Membranes* (1st ed.). Humana Totowa, NJ. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4>
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., & Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. In *Developmental Biology* (Vol. 95). www.pnas.org.
- Smith, J. R., Maguire, S., Davis, L. A., Alexander, M., Yang, F., Chandran, S., French-Constant, C., & Pedersen, R. A. (2008). Robust, Persistent Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells Is Achieved with AAVS1-Targeted Integration. *Stem Cells*, 26(2), 496–504. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0039>
- Sonntag, K. C., Song, B., Lee, N., Jung, J. H., Cha, Y., Leblanc, P., Neff, C., Kong, S. W., Carter, B. S., Schweitzer, J., & Kim, K. S. (2018a). Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 168(March), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.005>
- Sonntag, K. C., Song, B., Lee, N., Jung, J. H., Cha, Y., Leblanc, P., Neff, C., Kong, S. W., Carter, B. S., Schweitzer, J., & Kim, K. S. (2018b). Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 168, pp. 1–20). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.005>

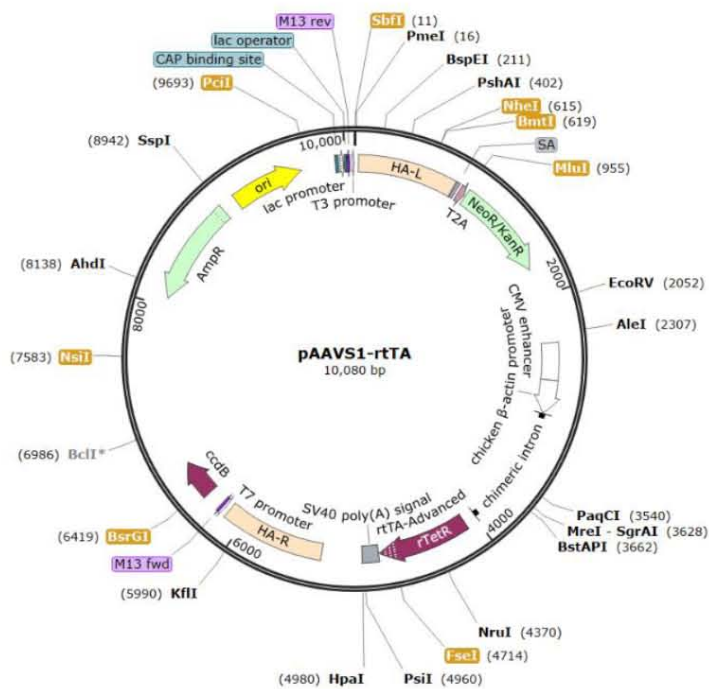
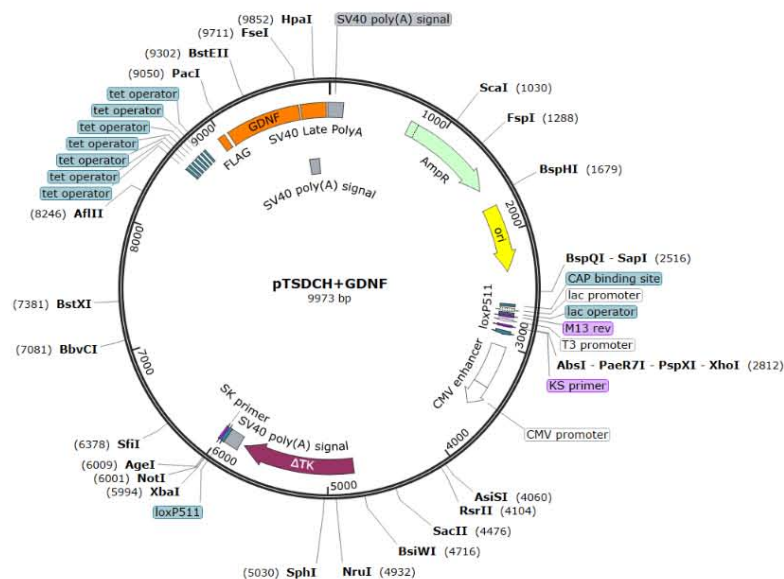
- Sulzer, D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.009>
- Sun, M., Gao, A. X., Liu, X., Yang, Y., Ledesma-Amaro, R., & Bai, Z. (2023). High-throughput process development from gene cloning to protein production. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02184-1>
- Tabar, M. S., Hesarakhi, M., Esfandiari, F., Samani, F. S., Vakilian, H., & Baharvand, H. (2015). Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(3), 438. <https://doi.org/10.22074/CELLJ.2015.5>
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H. S., Sritanandomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fredd, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., ... Mitalipov, S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.024>
- Tan, Y. Y., Jenner, P., & Chen, S. Di. (2022). Monoamine Oxidase-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of Parkinson's Disease*, 12(2), 477–493. <https://doi.org/10.3233/JPD-212976>
- Tenenbaum, L., & 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. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 29. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2017.00029/BIBTEX>
- Tereshchenko, J., Maddalena, A., Bähr, M., & Kügler, S. (2014). Pharmacologically controlled, discontinuous GDNF gene therapy restores motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 65(2014), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.009>

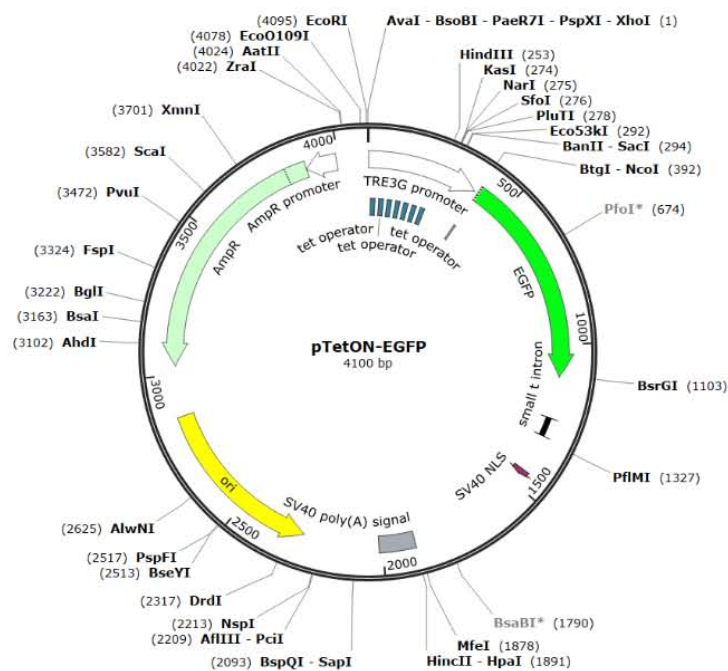
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5391.1145>
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7844–7848. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.17.7844>
- Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 605(4), 431–459. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(80\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0304-419X(80)90009-8)
- Tomac, A., Linsqviste, L.-F., Lin, H., Ogren, S. O., Young, D., Hoffer, B. J., & Olson, L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373, 335–339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/373335a0>
- Trounson, A., & DeWitt, N. D. (2016). Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 194–200. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.10>
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., & Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 7963–7968. <https://doi.org/10.1073/pnas.130192197>
- Vallier, L., Alexander, M., & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4495–4509. <https://doi.org/10.1242/jcs.02553>
- Vieyra, D. S., & Goodell, M. A. (2007). Pluripotentiality and Conditional Transgene Regulation in Human Embryonic Stem Cells Expressing Insulated Tetracycline-ON Transactivator. *Stem Cells*, 25(10), 2559–2566. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0248>
- Wang, M., Ling, K. H., Tan, J. J., & Lu, C. B. (2020). Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells*, 9(6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/cells9061489>
- Wang, Y. K., Zhu, W. W., Wu, M. H., Wu, Y. H., Liu, Z. X., Liang, L. M., Sheng, C., Hao, J., Wang, L., Li, W., Zhou, Q., & Hu, B. Y. (2018). Human Clinical-Grade Parthenogenetic ESC-Derived Dopaminergic Neurons Recover Locomotive Defects of Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease. *Stem Cell Reports*, 11(1), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.010>

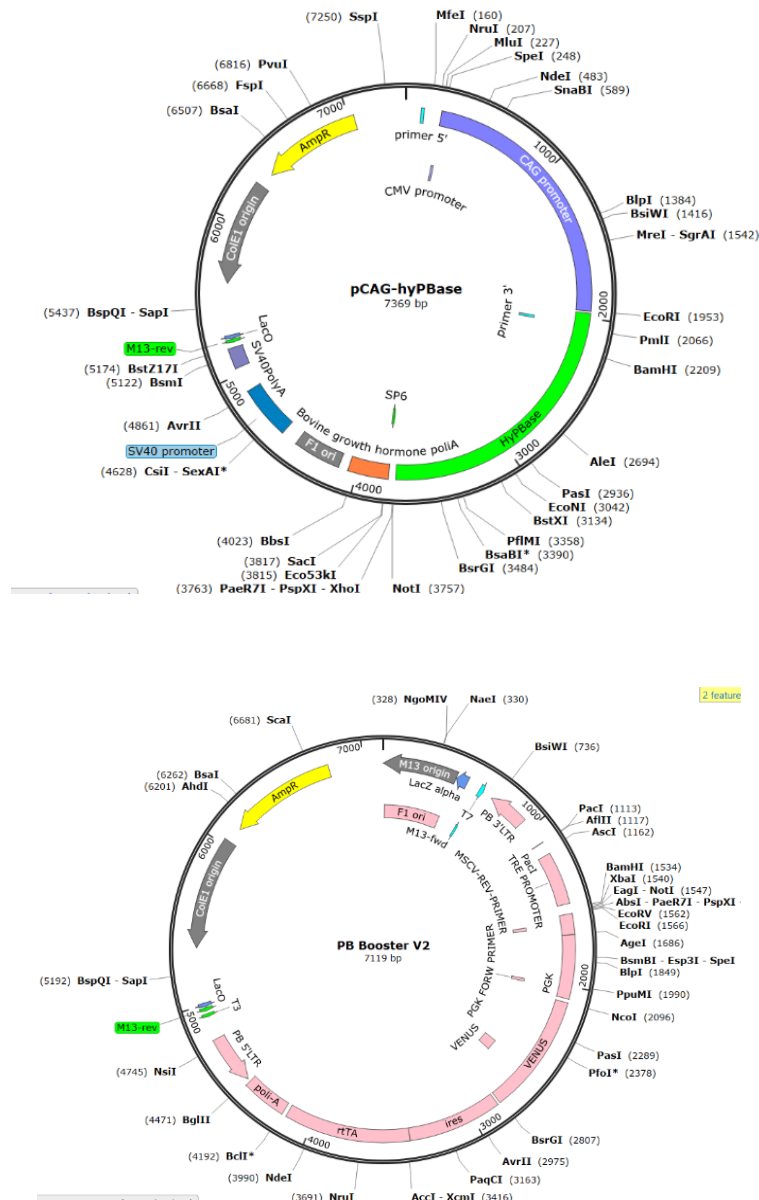
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J. H. (2016). Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:3, 17(3), 155–169. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28>
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
- Widmer, H. (2018). Combination of cell transplantation and glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting encapsulated cells in Parkinson's disease. *Brain Circulation*, 4(3), 114. https://doi.org/10.4103/bc.bc_19_18
- Wiley, L. M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Developmental Biology*, 105(2), 330–342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90290-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90290-2)
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), 971–974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>
- Yahr, M. D., Duvoisin, R. C., Shear, M. J., Barret, R. E., & Hoehn, M. M. (1969). The treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch. Neurol.*, 21(1–3), 343–354. <https://doi.org/10.1159/000245499>
- Yamanaka, Y., Lanner, F., & Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development (Cambridge, England)*, 137(5), 715–724. <https://doi.org/10.1242/DEV.043471>
- Yang, F., Feng, L., Zheng, F., Yang, F., Wu, C. P., & Shen, L. (2001). GDNF acutely modulates excitability and A-type K⁺ channels in midbrain dopaminergic neurons. *Nature Neuroscience* 2001 4:11, 4(11), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nn734>
- Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.-B., Fotter, E., Wang, Y., Havey, B., Miura, T., Backman, C., Chen, G.-J., Rao, M. S., & Freed, W. J. (2004). Dopaminergic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 22(6), 925–940. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-925>
- Zhu, S., Zhao, C., Wu, Y., Yang, Q., Shao, A., Wang, T., Wu, J., Yin, Y., Li, Y., Hou, J., Zhang, X., Zhou, G., Gu, X., Wang, X., Bustelo, X. R., & Zhou, J. (2015). Identification of a Vav2-dependent mechanism for GDNF/Ret control of mesolimbic DAT trafficking. *Nature Neuroscience* 2015 18:8, 18(8), 1084–1093. <https://doi.org/10.1038/nn.4060>

Anexos.

1. Mapa de los plásmidos utilizados.







15. **Figura 15.** Mapas de los plásmidos utilizados.

Se muestran los plásmidos con los elementos contenidos en cada uno, utilizados para distintos objetivos. El orden (de arriba abajo) es el mismo que el de la Tabla 1. Se detallan los sitios de corte únicos para enzimas de restricción

2. Secuenciación del amplificado NcoI-TetO GDNF-BsrGI.

Homo sapiens glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), transcript variant 1, mRNA					
Sequence ID: NM_000514.4 Length: 4171 Number of Matches: 1					
Range 1: 544 to 1197 GenBank Graphics				▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
789 bits(427)	0.0	581/656(89%)	7/656(1%)	Plus/Plus	
Query 1	GCCGGACGGGACTCTAAGATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCTGTCTGCCTGGTGTGCTC	60			
Sbjct 544	GCCGGACGGGACTTTAAGATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCTGTCTGCCTGGTGTGCTC	603			
Query 61	CACACCGCGTCTGCCTTCCCGCTGCCGCGCGTAAGAGGCTTCTCGAAGCGCCCGCGGAA	120			
Sbjct 604	CACACCGCGTCCGCTTCCCGCTGCCGCGCGTAAGAGGCTCCCGAGGCGCCCGCGGAA	663			
Query 121	GACCACTCCCTCGGCCACCGCCGCGTGCCCTTCGCGCTGACCAGTGACTCCAATATGCCC	180			
Sbjct 664	GACCGCTCCCTCGGCCGCGCGCGCGCCCTTCGCGCTGAGCAGTGACTCAAATATGCCA	723			
Query 181	GAAGATTATCTGACCAGTTTGATGACGTGATGGATTTTATTCAAGCCACCATCAAAAGA	240			
Sbjct 724	GAGGATTATCTGATCAGTTGATGATGTGATGGATTTTATTCAAGCCACCATCAAAAGA	783			
Query 241	CTGAAAAGGTCACCAGAT --- CAAGCGCGGCACTTCTCGAAGAGAGAGGAACCGGCAA	297			
Sbjct 784	CTGAAAAGGTCACCAGATAAACAATGGCAGTGCTTCTAGAAGAGAGCGGAATCGGCAG	843			
Query 298	GCTGCAGCTGCCAGCCAGAGAATTCCAGAGGGAAGGTGCGAGAGGCCAGAGGGGCAAA	357			
Sbjct 844	GCTGCAGCTGCCAACCAGAGAATTCCAGAGGAAAAGTTCGAGAGAGGCCAGAGGGGCAAA	903			
Query 358	AATCGGGGGTGCGTCTTAACTGCAATACACTTAAATGTCACTGACTTGGGTTTGGGCTAC	417			
Sbjct 904	AACCGGGGTTGTGTCTTAACTGCAATACATTTAAATGTCACTGACTTGGGCTGGGCTAT	963			
Query 418	GAAACCAAGGAGGAAGTATCTTTGATATTGTAGCGGTTCTGTGAAGCGGCCGAGACA	477			
Sbjct 964	GAAACCAAGGAGGAAGTATTTTATAGTACTGCAGCGGCTCTTGCGATGCAGCTGAGACA	1023			
Query 478	ATGTACGACAAAATACTAAAAATCTGTCTC -- GAAGTAGAAGGCTAACAGTGACAAGG	535			
Sbjct 1024	ACGTACGACAAAATATTGAAAAA-CT-TATCCAGAAATAGAAGGCTGGTGAGTGACAAAG	1081			
Query 536	TAGGCCAGGCATGTTGCAGGCCGGTCGCCTTCGACGACGACCTGTCGTTTTAGACGACA	595			
Sbjct 1082	TAGGGCAGGCATGTTGCAGACCCATCGCCTTTGATGATGACCTGTCGTTTTAGATGATA	1141			
Query 596	GCCTGGTTTACCATATCCTAAGAAAGCATTCCGCTAAACGGTGTGGATGTATCTGA	651			
Sbjct 1142	ACCTGGTTTACCATATTCTAAGAAAGCATTCCGCTAAAGGTTGTGGATGTATCTGA	1197			

16. **Figura 16.** Secuenciación del amplificado NcoI-TetO GDNF-BsrGI.

Alineamiento del amplificado (secuencia de arriba) producto de la reacción PCR especificada en el apartado 10.2 con el genoma de *Homo sapiens* (secuencia de abajo), que coincide con el transcrito del GDNF.