



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

E.N.E.P. IZTACALA.

BO1305/97
E. 2

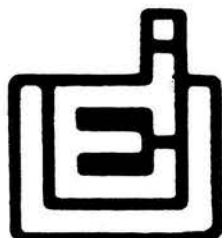
**Estudio morfofuncional comparativo entre los
transplantes de médula adrenal colocados en el
ventrículo lateral o en el parénquima estriatal.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA:

VERONICA ANAYA MARTINEZ.



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Fernando García Hernández.

TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MEX.

1997.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo a Mis Padres de quienes he recibido la comprensión y el apoyo incondicional en todo momento y circunstancia. Con mucho amor, GRACIAS.

A Ivonne, Fernando, René y Ericka por que siempre junto a ellos la vida es mejor.

A Raquel, Eva y Fabián por que llegaron a mi vida y le dieron nuevos matices.

A Ivan, Alexis y ... a los que vendrán, por existir.

A mi nigra !Rose; por tu amistad que ha rebasado galaxias y tu ayuda que es inconmensurable, porque siempre estas y eso es reconfortante.

A mis amiguísimos Lauris, Chucho, Enrrrique, Alicia, Natalia, Daniel y Leo por su ayuda y amistad, con las cuales sé que seguiré contando por siempre, gracias, muuuchas gracias.

A Samuel, Carlo, Paty, Olivia, Laura, Sofis, Sandra, Martha, Humberto, América, Liliana y Alejandra porque su amistad ha rebasado tiempo y espacio.

A mis familiares y amigos.

Agradecimientos:

Agradezco al *Dr. Fernando García Hernández* la paciente y esmerada revisión del presente reporte, porque sin su ayuda la realización de esta meta hubiera sido casi imposible, pero sobre todo le agradezco el haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y darme acceso a la investigación y a su potencial como maestro y amigo.

A las Doctoras *Erzsébet Marosi Holczberger* y *Leticia Verdugo Díaz* que, además de ocupar parte de su valioso tiempo en la revisión del escrito, se preocuparon por mi persona.

A los Doctores *Daniel Martínez Fong* y *Federico Bermúdez Rattoni* por su amable disposición para la revisión de este reporte, y sus críticas e invaluables sugerencias.

INDICE:

Resumen	1
Introducción	2
Transplantes al sistema nervioso	3
Modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas	4
MPTP	4
6-OHDA	5
Transplantes dopaminérgicos en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.	7
Factores que pueden afectar la sobrevivencia del tejido transplantado	8
Origen del donador y sitio de colocación del transplante.	8
Factores tróficos.	10
Barrera Hematoencefálica	11
Edad del sujeto donador	12
Crioconservación del tejido.	13
Efecto de la crioconservación del tejido sobre la conservación del volumen del transplante, la sobrevivencia celular y el efecto funcional de los transplantes dopaminérgicos.	14
Vascularización del tejido transplantado.	15
Otras estirpes celulares.	16
Cotransplantes.	17

Efecto de los Factores tróficos sobre el volumen del trasplante, la supervivencia celular y el efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos	18
Efecto de los inactivantes de radicales libres sobre el volumen del trasplante, la supervivencia celular y el efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos.	19
Sobrevivencia celular y efectos funcionales de los trasplantes dopaminérgicos en el modelo animal y en la enfermedad de Parkinson.	20
Trasplante de mesencéfalo ventral en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.	20
Interacción entre el tejido proveniente del mesencéfalo fetal y el núcleo caudado anfitrión.	21
Actividad electrofisiológica registrada después del implante de tejido de mesencéfalo fetal en animales con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.	22
Trasplantes de mesencéfalo fetal en humanos con la enfermedad de Parkinson.	23
Empleo de la médula adrenal como proveedora de dopamina	23
Trasplantes de médula adrenal en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson	25
Trasplante de médula adrenal en humanos con la enfermedad de Parkinson.	26
Comparación entre el efecto funcional de los trasplantes de médula adrenal y los trasplantes de mesencéfalo ventral.	27
Zona de colocación del trasplante -ventrículo lateral VS parénquima estriatal-.	28
Volumen del trasplante, supervivencia celular y efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos	

en el modelo experimental y la enfermedad de Parkinson.	31
Objetivo	34
Hipótesis	34
Método	35
Resultados	39
Aspectos motores	39
Volumen del trasplante	41
Sobrevivencia celular	42
Area del soma celular	43
Discusión	44
Aspectos motores	44
Sobrevivencia celular	46
Volumen del trasplante y supervivencia celular	48
Conclusión	51
Bibliografía	52

RESUMEN:

Al transplantar la médula adrenal al estriado denervado de dopamina existe escasa sobrevivencia del tejido implantado, limitando la capacidad del trasplante para reducir las deficiencias motoras en animales experimentales. En el presente estudio se estableció la correlación entre las deficiencias motoras, el sitio de implantación y la sobrevivencia de los trasplantes de médula adrenal fetal. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar que mostraron giro inducido (200 o más giros durante un período de 30 minutos) ante la aplicación de apomorfina (0.25mg/kg i.p.), después de la inyección unilateral de 6-hidroxidopamina en el haz medial del cerebro anterior. Un mes después de la denervación se formaron 3 grupos a los que se implantó tejido obtenido de la médula adrenal fetal: Grupo ventrículo (n=9) - se inyectó 1 μ l de tejido al ventrículo lateral ipsilateral a la lesión, Grupo Caudado 1 (n=8) - se inyectó 1 μ l de tejido en el interior del parénquima del núcleo caudado ipsilateral a la lesión; y en el grupo Caudado 5 (n=9) - se inyectaron 5 μ l de tejido en el interior del parénquima del núcleo caudado ipsilateral a la lesión. Se realizaron pruebas de giro inducido por apomorfina durante las semanas 2, 4, 6 y 8 postransplante. Posteriormente se sacrificó a los animales y se realizó el análisis histológico en cortes seriados en donde se localizó el trasplante mediante inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa. Con la ayuda de un programa de análisis de imágenes se calculó el volumen del tejido transplantado remanente, así como el número y tamaño de las células inmunorreactivas dentro del implante. Nuestros resultados muestran que la conducta de giro alcanzó porcentajes de cambio de cerca del -11% en los tres grupos, sin diferencias estadísticamente significativas intra y entre grupos. En el grupo con trasplante en el ventrículo se presentó el mayor volumen de tejido remanente, el mayor número de células teñidas y las células con soma de mayor área; mientras que entre los grupos con el trasplante colocado dentro del parénquima estriatal no hubo diferencias significativas. Estos resultados muestran que a pesar de que los trasplantes colocados en el ventrículo lateral crecen mejor, sus efectos funcionales al igual que los efectos ejercidos por los trasplantes colocados en el parénquima estriatal no son significativos.

Las diferencias respecto al desarrollo del trasplante (el volumen del tejido, la cantidad de células inmunorreactivas a TH y el tamaño del soma de éstas) entre ambos lugares de colocación del tejido adrenal puede estar relacionado con la existencia de nutrientes en el medio que llegan en mayor cantidad al tejido colocado en el ventrículo, mientras que el tejido transplantado estriatalmente presenta un escaso desarrollo debido a la limitada cantidad de nutrientes a la que tiene acceso el tejido, ya que la vascularización del tejido no es inmediata al implante.

INTRODUCCION

La muerte celular en el sistema nervioso, usualmente se traduce en la manifestación de algunas enfermedades. Los ganglios basales son frecuentemente afectados por procesos neurodegenerativos, que se manifiestan como trastornos del movimiento. Los ganglios basales son un conjunto de núcleos cerebrales estrechamente interconectados los cuales son el mayor eslabón subcortical entre las áreas sensoriales y motoras de la corteza cerebral, y son un sitio de convergencia e integración de diversas aferencias (DeLong, 1974). Entre las enfermedades neurodegenerativas que afectan a los ganglios basales se encuentra la enfermedad de Parkinson, la cual tiene como característica principal la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra compacta*.

Con el fin de contar con un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, es posible inducir en animales la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, mediante la inyección de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). La inyección unilateral de 6-OHDA en el haz nigro-estriatal de la rata produce alteraciones posturales en el lado lesionado. Si el animal es inyectado con agonistas dopaminérgicos comienza a rotar (conducta de "giro"). Siendo ésta una medida del grado de denervación dopaminérgica estriatal fácil de registrar.

Para disminuir las alteraciones motoras producidas por la enfermedad de Parkinson se emplea la L-DOPA, un precursor bioquímico de la dopamina; el cual compensa, al menos temporalmente, los déficits motores ligados a dicha enfermedad. Sin embargo, con el paso del tiempo el efecto benéfico de la L-DOPA se vuelve deficiente, por lo que en algunos casos se hace necesario recurrir a un tratamiento alternativo.

Se ha considerado que el efecto benéfico temporal mostrado por el fármaco se debe a que la enfermedad de Parkinson aún cuando se caracteriza principalmente por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra compacta* y la consiguiente pérdida de dopamina estriatal, también implica un desbalance bioquímico que afecta a otras de las estructuras que conforman los ganglios basales, y probablemente la aplicación de la L-Dopa no puede compensar todas las alteraciones en dichas estructuras. A pesar de

ello el compensar la disminución de la dopamina estriatal, es hasta el momento, el tratamiento más eficaz para disminuir los síntomas motores relacionados con dicha enfermedad.

El otro método empleado en sujetos afectados con el modelo experimental o con la enfermedad de Parkinson, es el trasplante de tejido catecolaminérgico dentro del cuerpo estriado o en áreas adyacentes. El injerto de tejido catecolaminérgico ha mostrado resultados contradictorios respecto a la recuperación funcional de las personas y animales transplantados, por lo que es necesario aprovechar el modelo experimental de dicha enfermedad para realizar investigación que arroje información sobre la enfermedad y los tratamientos más eficientes.

TRANSPLANTES AL SISTEMA NERVIOSO.

El primer intento por transplantar tejido nervioso al cerebro fue reportado en 1890 por Thompson quien transplantó piezas de corteza occipital de un perro adulto a otro, así como de gato adulto a perros adultos con resultados poco alentadores. Posteriormente una investigación más extensa fue realizada por Saltykow en 1905 quien quitó y reemplazó bloques de corteza cerebral en conejos adultos, encontrando sobrevivencia del tejido transplantado después de 8 días de la cirugía. Con resultados desalentadores Del Conte en 1907 empleó tejido nervioso central de fetos de conejo y lo implantó en la corteza cerebral de conejos adultos, reportando la presencia de masas de tejido sin neuronas reconocibles. Los experimentos continuaron pero fue hasta 1930 cuando se reportó que el tejido cerebral neonatal implantado en la cavidad anterior del ojo de la rata sobrevive al trasplante (May, 1930). Dicho modelo experimental proporcionó resultados satisfactorios en cuanto a la viabilidad de los trasplantes (May, 1945) llegando a ser uno de los modelos más empleados, arrojando valiosa información sobre el crecimiento y regeneración del tejido nervioso. Estas y muchas otras investigaciones dieron pie a que surgiera el interés por realizar más trabajos con el fin de abrir las posibilidades de emplear tejido extraído del sistema nervioso y transplantarlo al sistema nervioso central como una forma de generar conocimiento sobre la función, recuperación, regeneración y desarrollo

de conexiones en el sistema nervioso.

Los éxitos y fracasos obtenidos en la experimentación con animales, proporcionaron las bases para considerar los problemas que se deben enfrentar en la implementación de las técnicas y procedimientos de trasplante al sistema nervioso.

En la actualidad, la técnica de trasplante al sistema nervioso, es ampliamente utilizada en el estudio experimental de las enfermedades neurodegenerativas con el fin de inducir la recuperación de funciones en animales.

Modelos experimentales de las enfermedades neurodegenerativas.

Diversos químicos neurotóxicos han sido empleados como herramientas para estudiar los mecanismos básicos que regulan la función neuronal a nivel celular, molecular y conductual. El objetivo de su empleo, ha sido crear modelos animales de enfermedades neurodegenerativas detectadas en humanos. Entre las neurotoxinas selectivas que pueden afectar a las neuronas catecolaminérgicas se encuentran el 1-metil-4, fenil-1,2,3,6,-tetrahidropiridina (MPTP) y la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Winn, 1991), las cuales han sido ampliamente utilizadas en animales experimentales con el fin de inducir un estado deficiente de dopamina similar al observado en pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson.

MPTP

Mediante la administración sistémica y prolongada de MPTP se puede desarrollar en algunos mamíferos un síndrome neurológico con síntomas similares a los presentados por personas afectadas con la enfermedad de Parkinson (Langston y cols., 1984).

Entre los organismos sensibles a esta neurotoxina se han reportado humanos, gatos, perros, ratones y monos (Heikkila y cols., 1985; Johannessen y cols., 1985), siendo las dos últimas especies las más sensibles al efecto tóxico. En roedores, la administración periférica del MPTP, o el ión 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) produce sólo una pérdida parcial de la dopamina estriatal y no ocurren déficits motores persistentes. Cuando la administración del MPTP es sistémica disminuye el número de las neuronas nigrales

inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH) en un 80-95% -enzima limitante de la síntesis de dopamina- y se reduce los niveles de dopamina estriatal y sus metabolitos causando aquinesia (Hallman y cols., 1985; Heikkila y cols., 1984). La recuperación de la aquinesia y la reaparición de neuronas nigrales inmunoteñidas con TH se presenta después de un mes sin tratamiento, pero es hasta pasado un año sin la administración de la toxina cuando se da la recuperación del 60-100% de las neuronas (Donnan y cols., 1987; Nishi y cols., 1989).

En monos la infusión del MPTP unilateral a través de las arterias carótidas produce hemiparkinsonismo caracterizado por rigidez, temblor, bradiquinesia y heminegligencia. Estos animales emiten conducta de giro espontánea unilateral que puede ser revertida por la administración sistemática de agonistas dopaminérgicos (Bankiewicz y cols., 1986). Cuando en estos organismos se administra el MPTP de forma bilateral y sistemática se producen severas deficiencias motoras como son bradiquinesia, aquinesia, rigidez muscular, temblor y postura encorvada, deficiencias semejantes a las presentadas por los humanos afectados con la enfermedad de Parkinson (Langston y cols., 1984; Carman y cols., 1991). En primates el síndrome es irreversible espontáneamente, y se requiere el tratamiento con fármacos agonistas dopaminérgicos para encontrar tendencia a la recuperación (Davis y cols., 1979).

6-OHDA

En 1971(a) Ungerstedt reportó los resultados de los experimentos en los cuales empleando ratas, causó la destrucción unilateral de la sustancia nigra compacta mediante la inyección de la neurotoxina selectiva a catecolaminas 6-Hidroxidopamina (6-OHDA). La depleción selectiva de las neuronas dopaminérgicas se realiza con la inyección de la neurotoxina en la sustancia nigra o en la vía nigroestriatal donde es incorporada al interior de las neuronas dopaminérgicas a través de los sistemas de recaptura de dopamina de alta afinidad, provocando la acumulación intraneuronal de compuestos citotóxicos que producen la degeneración de las terminales axónicas y los cuerpos

celulares (Heikkila y Cohen, 1971; Zigmond y cols., 1990).

Inmediatamente después de la lesión las ratas muestran una tendencia espontánea a caminar en círculo ("girar" o "rotar") hacia el lado de la lesión (ipsilateral). Se sabe que la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior disminuye las concentraciones de dopamina en el núcleo caudado hasta un 95% (Ungerstedt, 1971b). Además de la degeneración de las terminales dopaminérgicas en el estriado lesionado y el giro espontáneo, se ha observado un síndrome conductual caracterizado por negligencia sensorial contralateral a la lesión (Zager y Black, 1988; Borges, 1988; Becker, y cols., 1990a).

Explorando la conducta motora a través del empleo de fármacos agonistas dopaminérgicos, Ungerstedt (1971a) encontró que al aplicar agonistas directos como la apomorfina las ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA presentaban movimientos rotatorios formando círculos hacia el lado contralateral a la lesión. Este hecho se explicó a través de la proliferación de receptores dopaminérgicos; fenómeno conocido como hipersensibilidad por denervación, y que surge a partir de la necesidad del sistema para aprovechar la dopamina existente (Ungerstedt, 1971a; b; Christie y Crown, 1971; Miller y Beninger, 1991),

La conducta de giro también puede ser inducida con la administración de anfetaminas las cuales causan la liberación de la dopamina en el caudado contralateral a la lesión (Ungerstedt, 1971b) de tal forma que el animal lesionado unilateralmente gira típicamente en dirección hacia donde el sistema dopaminérgico tiene la mayor actividad.

El número de giros que el animal emite después del tratamiento se pueden registrar sin dificultad (Segen y Pappas, 1988) y provee una estimación confiable de la extensión de la depleción de dopamina (Schmidt y cols., 1982). De tal forma, que si al animal depletado unilateralmente se le administra apomorfina y se registra que emitió 100 o más giros en un período de 30 minutos se puede decir que la denervación de dopamina estriatal equivale al 95% del total (Ungerstedt, 1971a; Hefti y cols., 1980; Dravid y cols., 1984).

Debido a lo relativamente sencillo de la aplicación de la neurotoxina, mantenimiento

y costo de los roedores, comparado con primates, así como a la facilidad de registrar conductualmente las alteraciones del sistema nigroestriatal, éste es uno de los modelos más empleado para investigar los aspectos relacionados con la neurodegeneración y recuperación del sistema nervioso central. De hecho gran parte de los reportes sobre trasplantes intracerebrales se han realizado empleando el modelo en rata de la enfermedad de Parkinson.

Trasplantes dopaminérgicos en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

El modelo propuesto por Ungerstedt fue aceptado rápidamente y es empleado actualmente como uno de los modelos animales más utilizados de la enfermedad de Parkinson. Hacia 1979, dos estudios independientes, realizados por Perlow y colaboradores y por Björklund y Stenevi mostraron que el tejido fetal de mesencéfalo ventral, el cual contiene la sustancia nigra en desarrollo, al ser colocado en el ventrículo ipsilateral a la lesión o en una cavidad dorsal en la cabeza del caudoputamen reduce las deficiencias motoras, inducidas en ratas por la inyección de 6-OHDA en la vía nigroestriatal (Perlow, y cols., 1979; Björklund y Stenevi, 1979). Posteriormente Freed y colaboradores (1980) reportaron que las concentraciones de dopamina, se incrementan en las zonas del núcleo caudado adyacentes al trasplante, tales concentraciones están relacionadas con la disminución del giro inducido. Dichos cambios persistieron hasta 6 meses después del trasplante.

Los trasplantes dopaminérgicos colocados en el estriado disminuyen los trastornos motores en los animales denervados de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Los cambios en las concentraciones de la dopamina estriatal se han demostrado en ausencia relativa de conexión axonal directa entre el trasplante y el cerebro receptor, sugiriendo que el efecto funcional del trasplante está mediado por intercambio de sustancias entre ambos tejidos (Rosenstein y Brightman, 1978; Freed y cols., 1981; Herrera-Marschitz y cols; 1984; Schneider y cols., 1994).

A pesar de lo anterior, se ha llegado a plantear que un aspecto fundamental para

que el efecto funcional del trasplante de tejido dopaminérgico sea significativo, es la interconexión que se establece entre las células del tejido implantado y las neuronas del caudado receptor (Freed y cols., 1984; Freund y cols., 1985). Los análisis morfológicos ultraestructurales muestran la presencia de contactos sinápticos normales del tejido transplantado con las neuronas espinosas medianas del estriado receptor (Freund y cols., 1985) población neuronal predominante en el estriado (95%) (Fox y cols. 1971).

Aún cuando hay varios aspectos a considerar, los cuales se están investigando, diversos autores coinciden en señalar que el aspecto más importante para que el trasplante ejerza su efecto funcional es la sobrevivencia del tejido transplantado. Desgraciadamente, antes, durante y después del trasplante el tejido pasa por un proceso en el que existen varios factores que afectan su sobrevivencia.

Factores que pueden afectar la sobrevivencia del tejido transplantado.

Origen del donador y sitio de colocación del trasplante.

Uno de los factores que puede afectar la sobrevivencia del tejido transplantado es la procedencia del tejido a implantar, debido a que se puede presentar el rechazo del trasplante si los organismos no son genéticamente compatibles. Existen diversas clasificaciones respecto al sitio de colocación y procedencia del trasplante, a continuación se señalan las denominaciones más comunes y su significado - basado en la descripción hecha por Freed y colaboradores (1984) - :

Transplante autólogo: el tejido proviene y se implanta en el mismo individuo.

Transplante sinérgico o isogénico: la procedencia y el implante se realizan entre individuos genéticamente similares.

Transplante Homogénico: la procedencia y el implante del tejido se realiza entre sujetos de la misma especie en los que no se conocen sus similitudes genéticas.

Transplante Alogénico: el sujeto del que procede el tejido y el sujeto en que se

implanta son de la misma especie pero genéticamente distintos.

Transplante Heterogénico: el individuo donador y el individuo receptor son de diferentes especies.

Transplante Xenogénicos: el sujeto donador y el individuo receptor son de diferente orden.

Transplante homotópico: el tejido se coloca en la misma zona de la que se extrajo.

Transplante heterotópico: el tejido se coloca en una zona diferente de la que se extrajo.

Cabe señalar que en los dos primeros tipos de trasplantes mencionados no se corre el riesgo de que el organismo receptor rechace el trasplante debido a la similitud genética entre donador y receptor. Los dos tipos de trasplantes señalados al final se combinan con las otras denominaciones, de tal forma que pueden hacerse trasplantes autólogos homotópicos o trasplantes autólogos heterotópicos, etc.

Respecto al empleo de tejido isogénico en trasplantes homotópicos es importante señalar que se emplea frecuentemente con resultados alentadores respecto a la integración, la sobrevivencia celular y la recuperación de funciones, como demuestran los trasplantes de caudado fetal implantados en el caudado de animales adultos (Isacson y cols., 1985; Walker y cols., 1987; Roberts y DiFiglia, 1988; Wictorin y cols., 1989; Zhou y cols., 1989) o los trasplantes de neuronas dopaminérgicas de rata al caudado adulto de animales de la misma especie.

Cuando se realizan trasplantes xenotópicos generalmente se realiza un tratamiento previo durante y después del implante, administrando inmunosupresores para disminuir las probabilidades de que el organismo receptor rechace el tejido transplantado. Desgraciadamente el empleo de estos inmunosupresores tiene consecuencias negativas para el organismo al disminuir las defensas y quedar expuesto a contraer diversas enfermedades.

Con el fin de optimizar el empleo de tejido o células en alotrasplantes o xeno trasplantes, sin la necesidad de aplicar inmunosupresores, se han empleado cápsulas de polímeros que son inmunológicamente inertes y semipermeables, permitiendo la

entrada de nutrientes y salida de constituyentes de bajo peso molecular (Emerich y cols., 1992). Empleando el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson se ha realizado el implante de células productoras de dopamina provenientes de bovino contenidas en cápsulas de polímeros al caudado de ratas adultas, lográndose evitar el rechazo del trasplante y presentándose reducción del giro inducido durante un lapso de 4 semanas (Aebischer y cols., 1991).

Factores tróficos.

Los factores de crecimiento neural son moléculas que apoyan la sobrevivencia de las neuronas en desarrollo (Edgar y Barde, 1983). El interés en los factores de crecimiento surge por dos razones: la observación de la muerte neuronal natural como un fenómeno de rápido incremento durante el desarrollo de los vertebrados (Hamburger y Oppenheim, 1982); y por la evidencia de que las moléculas tróficas previenen la pérdida neuronal al ser segregadas por el tejido circundante (Berg, 1982; Hamburger y Oppenheim, 1982).

Debido a la acción benéfica que han mostrado los factores de crecimiento se ha abierto la posibilidad para emplearlos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En el caso específico de las las neuronas dopaminérgicas se sabe que tienen la habilidad de responder a factores tróficos, aunque se desconoce específicamente a cuáles (Tomozawa y Appel, 1986; Lindsay y cols., 1993; Carvey y cols., 1993). Varios experimentos sugieren el posible aumento en el desarrollo de las fibras dopaminérgicas provisto por la influencia trófica derivada del cotrasplante (Jaeger, 1986; DeBeaurepaire y Freed, 1987; Watts y cols., 1990; Yurek y cols., 1990; Sladek y cols., 1993a). Una evidencia clara de la importancia de la presencia de los factores de crecimiento junto al tejido transplantado son los resultados reportados por Pezzoli y colaboradores (1988) quienes transplantaron intraventricularmente células cromafines y células no cromafines, ambas con infusión del factor de crecimiento nervioso (NGF), encontrando que los dos tipos de tejido implantado reducen el giro inducido característico de los roedores depletados unilateralmente de dopamina estriatal. Sin embargo, la sola infusión de NGF no es capaz de reducir el giro inducido en ratas con depleción unilateral

de la dopamina (Stromberg y cols., 1985; Olson y cols., 1985; Pezzoli y cols., 1988).

Se ha propuesto que la viabilidad de los trasplantes de células cromafines a los ganglios basales está limitada por los bajos niveles de NGF en el estriado (Springer, 1988). En ratas, los trasplantes de médula adrenal colocados en el estriado en presencia de altas concentraciones de NGF, incrementan la sobrevivencia de células cromafines significativamente (Bing y cols., 1988; Stromberg y cols., 1985). En cultivo, las células cromafines acompañadas de segmentos de nervio sural o expuestas a NGF exógeno muestran fenotipo neural e inmunorreactividad a TH (Kordower y cols., 1990). Puchacz y colaboradores (1993) indicaron que la médula adrenal contiene bFGF el cual regula la expresión de TH y de los genes para proencefalina en las células de la médula adrenal.

Desafortunadamente el potencial clínico del NGF y otros factores tróficos en el tratamiento de los desórdenes neurodegenerativos del sistema nervioso central es incierto debido a su inhabilidad de cruzar la barrera hematoencefálica (Carswell, 1993).

Barrera Hematoencefálica.

Los trasplantes intracerebrales, de cualquier área o tipo, después de ser colocados ocasionan la alteración de la barrera hematoencefálica, alteración que deja expuesto al tejido transplantado a químicos, hormonas, y sustancias transportadas por el torrente sanguíneo (Rosenstein, 1987; Broadwell y cols., 1991).

Se ha reportado que en los trasplantes de células dopaminérgicas el desarrollo del tejido es extremadamente limitado probablemente porque la interconexión entre el trasplante y el estriado se dificulta por la ruptura de la integridad física al colocar el trasplante, lo que deja al tejido transplantado sin los requerimientos nutricionales necesarios para la sobrevivencia de las células contenidas en el nuevo medioambiente (Freed y cols., 1984).

Para investigar el grado de alteración de la barrera hematoencefálica y el tiempo en que persiste dicha alteración, se utiliza la inyección intravenosa de peroxidasa de rábano, que al ser transportada por el torrente sanguíneo puede llegar al cerebro y en caso de existir alteraciones de la barrera hematoencefálica la peroxidasa se difunde en

la zona afectada quedando como marcador. Empleando esta técnica se ha reportado la reconstitución de la barrera hematoencefálica hacia los 7-10 días después del daño mecánico causado por falsos trasplantes insertando la punta de una jeringa en el parénquima del núcleo caudado o en el tercer ventrículo de ratas. Sin embargo, al transplantar tejido proveniente de la sustancia nigra fetal, en bloque o células en suspensión y colocarlos en el núcleo caudado o el tercer ventrículo se presentan evidencias de alteración de la barrera hematoencefálica 21 días postransplante (Broadwell y cols., 1991). Observaciones en el microscopio electrónico revelan que después del trasplante de médula adrenal hacia los tres (Kordower y cols., 1990) y nueve meses (Rosenstein, 1987) persiste la alteración de la barrera hematoencefálica, permitiendo el acceso de la peroxidasa de rábano al área del trasplante. Sin embargo, mediante el implante de tejido neural fetal en suspensión Geist y colaboradores (1991) reportan que a los 6 meses de haber colocado intracerebralmente el tejido neural no hay evidencias de alteración de la barrera hematoencefálica.

Edad del sujeto donador.

Se ha reportado que el tejido derivado del sistema nervioso muestra una sobrevivencia óptima postransplante cuando las células del tejido transplantado son embrionarias o se encuentran en estado activo de neurogénesis (Stenevi y cols., 1976; Das y cols., 1979), en el momento en que la mitosis se ha completado y las células comienzan la fase de desarrollo neurítico (Dunnett, 1992).

La edad del sujeto donador es un factor también importante en los trasplantes de células dopaminérgicas al neostriado denervado de catecolaminas, de tal forma que cuanto más joven es el sujeto del que se extrae el tejido, las posibilidades de que sobreviva el injerto son mayores (Lauder y Bloom 1974; Freed y cols, 1986; Brundin y cols., 1988; Nishino y cols., 1988), aparentemente, sin importar la edad del animal receptor (Chkirate, y cols., 1993). Sin embargo se ha reportado que entre más joven es el receptor, se puede favorecer la sobrevivencia de las células transplantadas y el crecimiento de fibras inmunorreactivas a TH adyacentes al trasplante (Date y cols., 1990).

El tejido humano en suspensión proveniente de mesencéfalo fetal sobrevive en el estriado denervado de dopamina de la rata por mayor tiempo, cuando es extraído de fetos con edades entre 6.5-8 semanas de gestación, en comparación con el tejido extraído de fetos con 11.5 semanas de gestación, presentando mayor sobrevivencia de células implantadas inmonorreactivas a TH, mayor extensión en redes de fibras teñidas con TH y disminución más pronunciada en el número de giros inducidos por apomorfina o anfetaminas (Brundin y cols., 1988).

Estudiando el efecto funcional de los trasplantes de mesencéfalo extraído de fetos de diferentes edades y colocado en el ventrículo lateral de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, se ha reportado que el mejor efecto, respecto a la disminución de la conducta de giro inducida por agentes químicos, se encuentra cuando el tejido es extraído entre los 11-17 días de gestación, ya que posteriormente la sustancia nigra implantada pierde muchas de sus propiedades para ejercer efectos funcionales (Simonds y Freed, 1990).

Crioconservación del tejido.

Con el fin de incrementar las posibilidades de realizar trasplantes con tejido fetal se ha investigado la viabilidad del empleo de tejido mesencefálico fetal mantenido en crioconservación. Con este propósito se han llevado a cabo experimentos con monos a los que se les implantó el tejido humano crioconservado; estudiándose la sobrevivencia de las células inmunorreactivas a TH se ha reportado que hay sobrevivencia en los trasplantes en los que se empleó tejido que estuvo hasta 2 meses en crioconservación, pero en menor porcentaje que cuando el trasplante es con células recién extraídas del donador (Redmond y cols., 1988; Frodl y cols., 1994).

El tejido mesencefálico fetal humano criopreservado también ha sido implantado en el estriado de humanos afectados por la enfermedad de Parkinson, con resultados favorables durante un año de seguimiento de los casos, tiempo durante el cual los pacientes mostraron recuperación funcional en el desempeño de actividades cotidianas,

y restauración de la síntesis bilateral de fluorodopa tritiada -mostrada mediante tomografía por emisión de positrones- (Spencer y cols., 1992).

Efecto de la crioconservación del tejido sobre la conservación del volumen del trasplante, la sobrevivencia celular y el efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos.

La crioconservación del tejido puede afectar la sobrevivencia del trasplante. Con el empleo de mesencéfalo fetal humano crioconservado por un año y posteriormente implantado intraestriatalmente en ratas con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, se ha reportado menor sobrevivencia celular acompañada de escasos procesos neuríticos positivos a TH y sin cambios en el giro inducido, al comparar con animales a los que se transplantó con tejido fresco en suspensión (Collier y cols., 1993). Por otro lado, cuando el tejido ha sido cultivado durante 1 semana y se transplanta intraestriatalmente en ratas adultas se observa la sobrevivencia y extensión de fibras en el área de implante, sin presentar diferencias con trasplantes no cultivados (Sorensen y cols., 1994).

Después del trasplante intraestriatal de mesencéfalo fetal humano crioconservado o fresco en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, Frodl y colaboradores (1994) reportan la disminución de la asimetría motora en los animales con trasplante de tejido fresco, disminución que se relacionó con el volumen del trasplante y el tamaño de las células inmunorreactivas a TH sobrevivientes, de tal forma que cuando el tejido se implantó fresco el volumen ocupado por el trasplante fue de $0.947 \pm 0.23 \text{ mm}^3$ conteniendo 3110 ± 789 células cuya área promedio fue de $1963.5 \mu\text{m}^2$. Cuando el tejido se mantuvo en congelación el volumen ocupado por el trasplante fue de $0.055 \pm 0.03 \text{ mm}^3$ conteniendo 397 ± 269 células con área promedio fue de $1140.09 \mu\text{m}^2$, desafortunadamente en este reporte no se aclara cuál fue el volumen inicial transplantado.

Se ha reportado que después de 40 días, en los trasplantes de tejido mesencefálico fetal crioconservado, la sobrevivencia de células inmunoteñidas a TH fue de 923 ± 138 células en trasplantes que conservaron en promedio un volumen de $0.29 \pm 0.04 \text{ mm}^3$.

Estos resultados fueron inferiores a los registrados en trasplantes de tejido fresco en fragmentos o en suspensión (Sauer y cols., 1992).

Vascularización del tejido transplantado.

Los trasplantes al cerebro pueden ser colocados como piezas sólidas "bloque", o células disociadas "suspensión". Para implantar el tejido en bloque, se requiere que el sitio de trasplante seleccionado cuente con una amplia vascularización para así aumentar las probabilidades de supervivencia celular (Stenevi y cols., 1976; Dunnett, 1992). Los mayores índices de supervivencia en trasplante de tejido en "bloque" se logran al colocar el tejido en los ventrículos laterales, probablemente debido a que en esta zona hay mayor cantidad de nutrientes que en el parénquima estriatal (Rosenstein y Brightman, 1978; Perlow y cols., 1979; Freed y cols., 1980). Otra forma, por medio de la cual se ha logrado incrementar las probabilidades de supervivencia, es hacer previamente una cavidad en el área receptora e implantar el tejido una vez transcurridas de 3 a 6 semanas. Se piensa que en estas condiciones la supervivencia se incrementa debido a que se forma un lecho vascular sobre el que se deposita el tejido (Björklund y Stenevi, 1979; Mahalik y cols., 1985; Dunnett, 1992).

Para el trasplante de células en suspensión, las células se disocian a partir de fragmentos de tejido del área de interés y se inyectan a la zona deseada. Además se puede combinar con algunos métodos para seleccionar las células de interés. Esta forma de trasplante presenta la ventaja de que en un menor volumen se tienen más células dopaminérgicas, además de que se puede controlar con facilidad el volumen de tejido a emplear.

Algunos autores han señalado que las células disociadas sobreviven al trasplante cuando son incorporadas al parénquima estriatal (Dunnett, 1992; Heim y cols., 1993), supervivencia que se ha relacionado con la vascularización del tejido implantado. Se ha propuesto que la vascularización se facilita por que las células injertadas al estar disociadas se integran al cerebro anfitrión con mayor facilidad (Dunnett, 1992; Leigh y cols., 1994).

Investigando el proceso de vascularización del tejido transplantado Broadwell y colaboradores (1991) disecaron bloques de cerebro de ratones con edad gestacional de 13 a 21 días, bloques en los que localizaron vasos sanguíneos y los transplantaron en el parénquima estriatal de ratones adultos. Encontrando 7 días después del transplante amplias redes de vasos sanguíneos contenidos en el tejido transplantado que se integraban homogéneamente a las redes formadas por los vasos sanguíneos del estriado receptor. Por otro lado, Leigh y colaboradores (1994) implantaron en el estriado de ratas adultas tejido fetal mesencefálico disociado, reportando que hacia las 3 semanas de haber transplantado se localizan dentro del transplante vasos sanguíneos con densidad y diámetro similar a los vasos sanguíneos encontrados en el estriado intacto, mientras que al colocar el tejido en piezas sólidas ambas características -densidad y diámetro- fueron significativamente menores.

Otras estirpes celulares.

Con el fin de optimizar la recuperación funcional al transplantar en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, se han desarrollado diversas estirpes celulares que mediante la modificación genética o selección específica producen sustancias consideradas relevantes en la sobrevivencia del transplante o en la recuperación dopaminérgica.

Las estirpes modificadas genéticamente se han empleado transplantándolas solas o en cotransplantes. Así, Horellou y colaboradores (1990) obtuvieron neuroblastomas de las células NS20Y las cuales sintetizan sólo L-Dopa y células neuroendocrinas AtT-20 las cuales producen dopamina y las transplantaron en ratas, encontrando que ambos tipos de transplantes disminuyen el giro inducido por apomorfina.

Empleando fibroblastos modificados genéticamente para producir DOPA -precursor dopaminérgico- y dopamina, se realizaron transplantes estriatales, reportándose el decremento en el giro inducido por apomorfina en ratas denervadas de dopamina unilateralmente, pero sin cambios al comparar los giros inducidos al aplicar anfetamina antes y después del transplante (Horellou y cols., 1991). Con la implantación intraestriatal

de células modificadas para producir tirosina hidroxilasa se ha reportado disminución del giro inducido pero sólo durante un período de 5 semanas (Jiao y cols., 1993).

Otra estirpe de células dopaminérgicas son las conocidas como PC12, las cuales al ser transplantadas en el estriado de ratas con denervación dopaminérgica logran la disminución del giro inducido por períodos de 3 a 4 semanas, tiempo después del cual el giro regresa a niveles preoperatorios, a pesar de la presencia de los metabolitos dopaminérgicos DOPAC y ácido homovanílico, registrado por diálisis en el área receptora, o la sobrevivencia de células inmunorreactivas a TH en el tejido transplantado (Winn y cols., 1991; Hori y cols., 1993).

En monos tratados con la neurotoxina MPTP, el implante en el caudo-putamen de cápsulas de polímeros conteniendo células PC12, ha mostrado que 6.5 meses después del trasplante se registra recuperación funcional en los animales, después de sacrificar a éstos se encontraron células viables contenidas en las cápsulas recuperadas (Kordower y cols., 1995).

Cotransplantes.

Con el propósito de incrementar la sobrevivencia de las células dopaminérgicas transplantadas al neostriado, se han realizado cotransplantes de médula adrenal y tejido que se conoce contiene factores tróficos. Así, Doering (1992) después de realizar cotransplante de células cromafines en suspensión y segmentos de nervio periférico, en el caudado de ratas denervadas unilateralmente de dopamina estriatal, reporta la sobrevivencia del 100% de las células 6 meses postransplante. Células que presentaron inmunotinción a TH, dopamina beta hidroxilasa y al receptor de baja afinidad al NGF; y que histológicamente conservaron las características ultraestructurales que normalmente presentan *in vivo*.

Utilizando cotransplantes del mismo tipo, en ratones pretratados con la neurotoxina MPTP se ha reportado la presencia de células inmunoteñidas a dopamina en el tejido transplantado, además de la presencia de fibras inmunoteñidas a dopamina adyacentes al área del trasplante hacia los 12 meses después de la cirugía. La medición de los

niveles de dopamina extracelular reveló el incremento de las cantidades de dopamina en el caudado receptor hasta un mes después del trasplante, con retorno hacia los 3 meses a niveles similares a los presentados en animales control, manteniéndose en niveles normales hasta 12 meses después del trasplante (Date y cols., 1993).

Utilizando astrocitos manipulados genéticamente para producir el NGF en cocultivo con células cromafines, se observó un extenso crecimiento neurítico y amplia sobrevivencia celular. Al realizar el cotransplante de estas células al estriado de ratas denervadas unilateralmente de dopamina se registró la triplicación del número de células sobrevivientes, comparando con trasplantes donde se emplearon solamente células cromafines (Cunningham y cols., 1991). Posteriormente, empleando ratas depletadas unilateralmente de dopamina estriatal Cunningham y colaboradores (1994), implantaron intraestriatalmente una suspensión que contenía médula adrenal y astrocitos que expresaban NGF, hacia las 10 semanas postransplante las células cromafines mostraron crecimiento neurítico extenso y sobrevivencia celular de 5 a 12 veces mayor que el observado en los trasplantes de células cromafines solas, además de que se presentó la disminución del 60% del giro inducido por apomorfina.

En ratas denervadas unilateralmente de dopamina estriatal se han realizado cotransplantes empleando fibroblastos productores del bFGF junto con neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Takayama y cols., 1995) o células cromafines (Chalmers y cols., 1995), presentándose un crecimiento mayor y ramificación de las células sobrevivientes en los trasplantes en contacto con los fibroblastos productores del bFGF. Sin embargo, el efecto funcional se registró sólo en el grupo transplantado con las neuronas dopaminérgicas. Por otra parte Haque y colaboradores (1995), empleando el mismo procedimiento que Takayama y colaboradores (op. cit.), reportan igual número de neuronas inmunorreactivas a TH sobrevivientes en trasplantes de células dopaminérgicas y en células dopaminérgicas en cotransplantes con células productoras de bFGF, encontrando reducción en el giro inducido por apomorfina sólo en los animales con trasplantes dopaminérgicos.

Efecto de los Factores tróficos sobre el volumen del trasplante, la sobrevivencia celular y el efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos.

Stromberg y colaboradores (1985) reportan que en ratas el trasplante intraestriatal de médula adrenal fetal en bloque, presenta sobrevivencia de 127 ± 29 de células cromafines después de tres meses de realizado el implante, pero la sobrevivencia se incrementa a más del triple (449 ± 103 células) cuando se realiza infusión continua de NGF al trasplante, infusión que ayuda a que las células presenten procesos neuríticos. Al igual que en otros experimentos, se encontró relación entre el aumento en el número de células sobrevivientes en el trasplante y la disminución del número de giros. Estos autores señalan que el número de células sobrevivientes en los distintos grupos de ratas transplantadas no varió con el transcurso del tiempo, por lo que postulan que la mayor pérdida celular ocurre durante y/o inmediatamente después del trasplante.

Se ha reportado que una vez transcurridos 3 meses después del trasplante de la médula adrenal del ratón adulto implantado en el núcleo caudado de ratones intactos, el volumen del tejido postrasplante en el mejor de los casos fué de $0.0045 \pm 0.0005 \text{ mm}^3$, conteniendo células inmunoteñidas a TH con somas de volumen de $512 \pm 17.9 \mu\text{m}^3$. El volumen del tejido y el volumen de los somas de las células contenidas en el trasplante se incrementaron cerca del 50% mediante la infusión de factores tróficos, de tal forma que al aplicar NGF el volumen del trasplante se incrementó a $0.0067 \pm 0.0002 \text{ mm}^3$ y el volumen de los somas celulares aumentó a $802 \pm 26.3 \mu\text{m}^3$ (Jousselin-Hosaja, 1993).

Efecto de los inactivantes de radicales libres sobre el volumen del trasplante, la sobrevivencia celular y el efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos.

Empleando el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson en la rata se realizó el implante intraestriatal de mesencéfalo fetal extraído de ratón, encontrándose que la sobrevivencia de las neuronas inmunoreactivas a TH fue alrededor de 310 células ocupando un volumen de 0.697 mm^3 , cifras que se incrementaron marcadamente cuando

el implante se realizó con tejido de ratones transgénicos (1250 células en un volumen de 0.812mm^3), que producían cerca de 3 veces más la enzima superoxidasa dismutasa (enzima encargada de inactivar a los radicales libres) (Nakao y cols., 1995).

Sobrevivencia celular y efectos funcionales de los trasplantes dopaminérgicos en el modelo animal y en la enfermedad de Parkinson.

Trasplante de mesencéfalo ventral en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

Los trasplantes de sustancia nigra fetal colocados en el parénquima del cuerpo estriado de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, pueden compensar algunas de las deficiencias motoras observadas en estos animales (Perlow y cols., 1979; Dunnett y cols., 1980; Björklund y cols., 1980; Freed y cols., 1980; Harman, 1985; Mahalik y cols., 1985; Nishino y cols., 1986a; Walters y cols., 1992; Wang y cols., 1994).

El implante de mesencéfalo fetal humano en ratas con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson ha presentado resultados diversos. Walters y colaboradores (1992) reportan supervivencia de algunas de las células transplantadas y disminución del giro inducido por apomorfina en pruebas realizadas durante un período de 6 meses. Con el mismo tipo de trasplantes colocado ipsilateralmente en el ventrículo de ratas depletadas unilateralmente de dopamina, se ha reportado la disminución del giro inducido por apomorfina hacia las dos semanas postrasplante, con revertimiento del giro a niveles preoperatorios después de 7 meses (Stromberg y cols., 1995).

La observación con microscopio de luz de los trasplantes de mesencéfalo fetal colocados intraestriatalmente ha revelado la presencia de fibras catecolaminérgicas (Perlow y cols., 1979; Björklund y cols., 1980; Gage y cols., 1983; Nishino y cols., 1986b), que al parecer se desarrollan siguiendo un proceso temporal. Así Clarke y colaboradores (1988) reportan la presencia de células inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa a las 8

semanas postransplante, pero con pocas fibras o sin ellas, mientras que en animales sacrificados hacia las 20 semanas después del transplante las fibras proliferan en la zona circundante al transplante.

Midiendo por diálisis la cantidad de dopamina en el caudado de monos tratados bilateralmente con MPTP y transplantados con tejido proveniente de mesencéfalo fetal se encontró un aumento del 24-50% en la dopamina en las zonas adyacentes al lugar del transplante, al comparar con el caudado contralateral. La sobrevivencia de los implantes fue de 550 - 15000 células inmunorreactivas a TH; las cuales ocupaban entre el 3 y el 8% del área del caudado receptor. Los resultados más favorables respecto a la sobrevivencia se presentaron en animales que recibieron tejido de donadores con menor edad de gestación (Sladek y cols., 1993b). En los monos tratados con MPTP a distintas edades, se registran mejoras conductuales sólo cuando se ha implantado tejido dopaminérgico que posteriormente muestra indicios de sobrevivencia celular (Taylor y cols., 1995). En monos se ha logrado incrementar el número de fibras y células inmunoteñidas a TH en el transplante intraventricular cuando se cotransplanta mesencéfalo con nervio periférico (Collier y cols., 1994).

Interacción entre el tejido proveniente del mesencéfalo fetal y el núcleo caudado anfitrión.

Los trasplantes de tejido mesencefálico en animales con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson interactúan y pueden alterar de diversas maneras al caudado anfitrión. Las observaciones hechas con la ayuda del microscopio electrónico indican que los trasplantes intraestriatales tienen apariencia madura hacia las 5-6 semanas de implante, pudiéndose identificar 6 tipos de neuronas y 8 tipos de terminales axónicas formando sinapsis simétricas y asimétricas con somas, dendritas, espinas y segmentos iniciales del axón de las neuronas del tejido receptor (Mahalik y cols., 1985). En este mismo período también se encuentran elementos inmunorreactivos a tirosina hidroxilasa pre y post-sinápticos en el estriado receptor; se han observado axones teñidos

en contacto sináptico con dendritas sin tinción y algunas dendritas inmunorreactivas fueron blanco postsináptico de terminales axónicas sin tinción (Mahalik y cols., 1985; Nishino y cols., 1986a; Mendez y cols., 1991). Los elementos anteriores evidencian la interconexión entre los trasplantes y el caudado receptor.

Los trasplantes de mesencéfalo fetal colocados ipsilateralmente en el ventrículo de ratas depletadas de dopamina inducen variaciones en el número de los receptores dopaminérgicos, así a los 2 meses postransplante se ha registrado disminución en el número de los receptores D₂, con normalización en la cantidad de estos receptores hacia las 4 meses al compararse con ratas lesionadas y sometidas a trasplante falso. Este hecho se correlacionó con los cambios presentados en la síntesis de RNAm para expresión de receptores D₂. Mientras que el RNAm para la expresión de receptores D₁ disminuyó moderadamente y en forma continua hasta los 7 meses postransplante (Stromberg y cols., 1995).

Actividad electrofisiológica registrada después del implante de tejido de mesencéfalo fetal en animales con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

Estudios electrofisiológicos han corroborado las evidencias morfológicas sobre la integración de los trasplantes de sustancia nigra o mesencéfalo ventral por medio de nuevas inervaciones dopaminérgicas. Al respecto Forni y colaboradores (1989) estimaron el crecimiento de las fibras dopaminérgicas desde los trasplantes mesencefálicos colocados en el estriado después de dos semanas de la cirugía, reportando una expansión del trasplante en una tasa máxima de 0.1mm por semana, señalando que la actividad de las neuronas transplantadas es similar a la actividad registrada en las neuronas dopaminérgicas individuales *in situ*. De igual forma Fisher y colaboradores (1991) describieron la actividad electrofisiológica extracelular de las neuronas de la sustancia nigra fetal colocada en estriado denervado de dopamina cinco meses después del trasplante, encontrando que dicha actividad es similar a la de las neuronas del mesencéfalo adulto. Recientemente Hudson y colaboradores (1994) reportaron que la tasa

de disparo intraestriatal en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA y transplantadas con células mesencefálicas es similar a la que se presenta en el estriado intacto, recuperación que no se observa cuando el trasplante que es colocado en el estriado proviene de otra parte del sistema nervioso central -núcleo arcuato, locus coeruleus o corteza cerebral-. Al parecer los trasplantes de tejido mesencefálico colocados en el parénquima estriatal normalizan las tasas de disparo de las neuronas del área registrada, (Forni y cols., 1989; Hudson y cols., 1994).

Trasplantes de mesencéfalo fetal en humanos con la enfermedad de Parkinson.

Respecto al funcionamiento de los trasplantes de mesencéfalo fetal humano implantado en humanos se han realizado cirugías colocando el tejido en bloque o suspensión. En los casos en que el tejido en bloque es puesto en el caudo-putamen se ha reportado la disminución de los síntomas de la enfermedad de Parkinson por períodos de hasta 3 años, coincidiendo con el registro de aumento en la recaptura de fluorodopa tritiada mostrado mediante tomografía por emisión de positrones (Lindvall y cols., 1992; 1994; Sawle y cols., 1992).

En los casos en que se empleó el tejido en suspensión y se inyectó en el núcleo caudado se han registrado mejoras en la postura y velocidad de movimientos de los pacientes, conservándose las mejoras por más de un año después de la operación con restauración en la síntesis de fluorodopa en el caudado transplantado (Spenser y cols., 1992; Hoffer y cols., 1992; Zabek y cols., 1994).

Empleo de la médula adrenal como proveedora de dopamina.

El empleo de la médula adrenal en trasplantes para compensar las deficiencias dopaminérgicas en el estriado anfitrión se dió a partir de que las células cromafines pueden producir y liberar cantidades considerables de catecolaminas (Freed y cols., 1981).

El origen común de las células cromafines y las neuronas del sistema nervioso central fue evidenciado hacia 1947 por Hammond e Yntema (citado en Cochard y cols., 1979) al estudiar el desarrollo de la cresta neural. Posteriormente se encontró que en los fetos de rata las primeras células cromafines en la cresta neural aparecen hacia los 11-12 días de gestación.

Tischler y colaboradores (1989) señalan que la tasa de proliferación de las células cromafines en la médula adrenal de ratas declina rápidamente después del nacimiento. Se ha reportado que los procesos mitóticos en la médula adrenal se ausentan o son extremadamente raros hacia los 60 días de edad (Jackson, 1919). Opuestamente Coupland y Tomlinson (1989) reportaron que la médula adrenal de rata continúa su incremento en volumen y las células cromafines aumentan su número y volumen hasta que el animal tiene alrededor de 22 meses de edad, dato relevante ya que como se mencionó anteriormente, se considera que la sobrevivencia de las células en tejido transplantado se incrementa cuando éstas son tomadas en etapas de crecimiento (Stenevi y cols., 1976; Das y cols., 1980; Dunnett, 1992).

En estudios *in vitro* Chang y Ramirez (1988) mostraron que una proteína parcialmente purificada de la médula adrenal de la rata al ser colocada en el estriado estimula la liberación de dopamina en cantidades considerables, y que dicha liberación se presenta en forma dosis dependiente. En cortes de médula adrenal de rata adulta se detectó con tinción inmunocitoquímica la proteína liberadora de dopamina (DARP) en células localizadas en el tejido de la corteza y la médula de esta glándula, las células inmunorreactivas tenían forma oval y presentaban tinción más intensa en el citoplasma que circundaba el núcleo (Choi, y cols., 1993).

Las características de la médula adrenal y sobre todo la disminución de los síntomas conductuales al colocar el trasplante intracerebralmente en los enfermos con enfermedad de Parkinson y en los animales con el modelo experimental de dicha enfermedad han puesto a este tejido entre los más empleados.

Transplantes de médula adrenal en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

Los reportes en los que se transplantó la médula adrenal con el fin de reducir los síntomas causados por la pérdida de las catecolaminas en el núcleo caudado, indican que el depositar el tejido extraído de la médula adrenal en el ventrículo lateral puede disminuir el giro inducido (Freed y cols., 1981; 1983; Jankovic y cols., 1989; Takashima y cols., 1992), pero sólo cuando hay sobrevivencia de las células cromafines transplantadas (Björklund y cols., 1980; Bing y cols., 1988) y/o aumento en las cantidades de la dopamina extracelular en el núcleo caudado depletado (Curran y cols., 1993).

Las células cromafines *In vivo*, al ser transplantadas intracerebralmente presentan una transformación morfológica parcial, siendo capaces de presentar procesos neuríticos en desarrollo e inervar la zona receptora (Olson, 1970; Unsicker y cols., 1978; 1980; 1985; Freed y cols., 1981; Vaquero y Coca, 1990; Fisher y Gage, 1993). Las evidencias indican que el fenotipo neural se expresa cuando no existen córticoesteroides en el medio (Olson, 1970; Wurman y cols., 1972; Unsicker y cols., 1978; 1980; Olson y cols., 1980; Tischler y Grenee, 1980) por lo tanto, al realizar transplantes de médula adrenal, es importante evitar incluir corteza adrenal, dado que los córticoesteroides contenidos en ella parecen mantener el fenotipo de las células cromafines (Freed y cols., 1984).

Los reportes del aumento en la cantidad de dopamina extracelular en el caudado anfitrión después del trasplante de la médula adrenal, indican que la concentración se relaciona con el número de células inmunorreactivas a TH presentes en el trasplante. El cotrasplante del tejido adrenal con tejido que secreta o contiene factores tróficos incrementa la sobrevivencia de las células cromafines implantadas (Date y cols., 1993; Cunningham y cols., 1994).

Cuando se hicieron los primeros transplantes autólogos de médula adrenal al parénquima estriatal de primates, los resultados fueron desalentadores ya que no se observó sobrevivencia del tejido transplantado o ésta fue muy escasa (Bohn y cols. 1987; Freed, 1988). Incluso existe el reporte de fibras inmunorreactivas a TH en la zona

adyacente al trasplante sin sobrevivencia de células (Bohn y cols, 1987; Hansen y cols., 1988). Tratando de incrementar la sobrevivencia celular Dubach y German (1990) planearon implantar el tejido proveniente de la médula adrenal tanto en el caudado como en el putamen del mismo animal, encontrando que con esta nueva técnica la sobrevivencia del tejido cromafin y la actividad enzimática a TH en las áreas anfitrionas aumentan de manera importante.

Trasplante de médula adrenal en humanos con la enfermedad de Parkinson.

En humanos, varios investigadores han optado por la alternativa del trasplante autólogo de médula adrenal (Backlund y cols., 1985; Madrazo y cols., 1987; Freed y cols., 1981; Stromberg y cols., 1984; Lieberman y cols., 1989) que como ya se señaló contiene células cromafines, las cuales producen catecolaminas (Kirshner, 1975). Los trasplantes autólogos de médula adrenal colocados en parénquima estriatal han presentado resultados contradictorios, de tal forma que mientras algunos autores señalan cambios favorables en las alteraciones motoras (Drucker-Colín y cols., 1988) y sobrevivencia del trasplante, con células y fibras inmunoreactivas a TH (Bakay y cols, 1990; Kordower y cols., 1991; Diamont y cols., 1994), otros investigadores mencionan cambios temporales con mejoras en la postura y en el desempeño de pruebas estandarizadas en períodos de 2 semanas a 6 meses y posterior regreso a niveles preoperatorios (Choi y cols., 1990; Bakay y cols., 1990; López-Lozano y cols., 1991; Zhang 1992) sobre todo en trasplantes que finalmente presentaron pocas células inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa y con procesos necróticos (Østergaard y Rasmussen, 1991).

También ha sido reportada la ausencia de cambios en las alteraciones motoras (Chung y cols., 1994), en los metabolitos dopaminérgicos, y en la actividad eléctrica cerebral (Machado-Salas y cols., 1990).

Cabe señalar la disminución gradual y significativa de los síntomas clínicos durante un período de dos años de seguimiento médico en un paciente cotransplantado bilateralmente con médula adrenal y nervio periférico (Date y cols., 1995).

Es importante considerar que en la enfermedad de Parkinson se relaciona con la alteración de los ganglios basales, y al transplantar el tejido catecolaminérgico como tratamiento para compensar las alteraciones motoras relacionadas con dicha enfermedad solo se está tratando de normalizar los niveles de dopamina estriatal, dejándose de lado cualquier otra alteración en la misma u otras estructuras, lo que podría explicar los resultados temporales, contradictorios y/o variados encontrados en sujetos sometidos al trasplante.

Comparación entre el efecto funcional de los trasplantes de médula adrenal y los trasplantes de mesencéfalo ventral.

Siendo que la mayor parte de los trasplantes para disminuir los síntomas causados por la denervación estriatal dopaminérgica unilateral se realizan empleando tejido proveniente de mesencéfalo ventral o médula adrenal algunos investigadores han diseñado experimentos comparando el efecto funcional de ambos tipos de tejido, interesados en comparar la conservación del volumen del trasplante intraestriatal. Lu y colaboradores (1990) inyectaron bilateralmente en ratas intactas $3\mu\text{l}$ de tejido proveniente de sustancia nigra, médula adrenal, corteza o estriado de animales neonatos y compararon las áreas ocupadas por el tejido en cada tipo de trasplante, reportando que la mayor conservación de tejido se presentó en los trasplantes de tejido cortical, seguido por la conservación del tejidos provenientes de los trasplantes donde se empleó la sustancia nigra y el estriado, mientras que los trasplantes de menor tamaño se encontraron en los casos donde se empleó tejido proveniente de la médula adrenal. Entre todos los tipos de trasplantes hubo diferencias estadísticamente significativas, excepto entre los grupos con trasplante proveniente de la sustancia nigra y el caudado.

Haciendo la comparación entre los trasplantes de sustancia nigra y los trasplantes de médula adrenal fetal colocados en el ventrículo contralateral de las ratas denervadas unilateralmente de dopamina estriatal, Mendoza-Ramírez y colaboradores (1991) reportan que a los 150 días después del injerto del tejido en bloque, la reducción del giro inducido por apomorfina fue del 41% en las ratas con trasplante de tejido de la

substancia nigra y del 34% en ratas con trasplante de la médula adrenal, pero sólo los trasplantes de médula adrenal normalizaron la densidad de los receptores dopaminérgicos en el estriado lesionado.

Zona de colocación del trasplante -ventrículo lateral VS parénquima estriatal-

Ha sido establecido que el trasplante al cerebro puede tener un mejor crecimiento y funcionamiento cuando es colocado en la misma zona de donde se extrajo, característica que es compartida por los trasplantes de células dopaminérgicas. *In vitro* se tienen evidencias de la estimulación del crecimiento de fibras de neuronas mesencefálicas cultivadas por la presencia de fragmentos de tejido estriatal, el crecimiento de tales fibras es mucho menor cuando se ponen las células en cocultivo con tejido obtenido de zonas que normalmente no son inervadas por neuronas dopaminérgicas (Prochiantz y cols 1979; DiPorzio y cols., 1980; Hemmendinger, y cols., 1981).

Björklund y colaboradores (1983) empleando ratas denervadas unilateralmente de dopamina, injertaron una suspensión de células mesencefálicas fetales en varias regiones del estriado y regiones no estriatales encontrando que la sobrevivencia y el crecimiento neurítico fue marcadamente mayor en las zonas normalmente inervadas por las neuronas dopaminérgicas. Las fibras crecieron desde el trasplante hacia el cerebro anfitrión sólo cuando se localizaron en la vecindad de las áreas blanco normales.

Implantando en el parénquima estriatal de ratas tejido mesencefálico fetal, se ha reportado que la sobrevivencia de células inmunoteñidas con TH es mayor cuando se implanta el tejido en ratas con depleción dopaminérgica en comparación con los trasplantes realizados en los animales sin depleción del mismo neurotransmisor. En general en el mejor de los casos el número de células inmunorreactivas localizadas en la zona del trasplante en ratas sin depleción fue de 9.25 células, mientras que para las ratas depletadas la sobrevivencia fue de 32.5 células (Sorensen y cols., 1994). Los datos anteriores dan indicio de que la necesidad de dopamina en el sistema denervado influye sobre la sobrevivencia de las células dopaminérgicas implantadas.

Otra condición importante para incrementar las posibilidades de sobrevivencia cuando se hace el injerto de células, es colocar el tejido en un entorno que favorezca al menos la conservación del implante. Comparando los trasplantes de células fetales mesencefálicas en suspensión colocadas en el ventrículo o en el parénquima estriatal, Nishino y colaboradores (1986a) señalan que la sobrevivencia e interconexión entre el tejido transplantado y el cerebro anfitrión es mayor cuando el tejido se implanta en los ventrículos -lateral o tercero-, pues la inmunotinción a TH en este tipo de trasplantes, además de ser más intensa, muestra mayor número de células con axón, y neuritas con ramificación abundante ocupando mayor extensión, hecho que se relaciona con el grado de disminución en el número de giros inducidos mediante la aplicación de meta-anfetamina. Cuando el trasplante conservó mayor número de células el giro fue menor. Estos autores relacionan el mejor desarrollo de los trasplantes intraventriculares con el menor daño mecánico o físico proporcionado por la zona de implante.

Se ha reportado que los trasplantes de médula adrenal colocados en el ventrículo lateral permanecen relativamente intactos, conteniendo células de forma redondeada inmunorreactivas a TH, después de 10 semanas del implante (Takashima y cols., 1992). Freed y colaboradores (1984) encontraron que dos meses después del trasplante intraventricular, las células cromafines reinervan el caudado, pero no tienen efecto sobre la conducta de giro inducida, presumiblemente debido a que las catecolaminas liberadas se difunden a través del líquido cerebroespinal llegando en cantidades mínimas al caudado, no pudiendo reducir la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos.

Los resultados respecto al efecto funcional de los trasplantes de médula adrenal colocados en el ventrículo y la sobrevivencia de éstos son contradictorios. En monos después del trasplante intraventricular de tejido adrenal, se han reportado altas concentraciones de dopamina en el estriado adyacente al trasplante, y sobrevivencia de células cromafines que reinervaron el estriado. Sin embargo, las pruebas con anfetamina y apomorfina no mostraron recuperación funcional (Morihisa y cols., 1984). Empleando el mismo tipo de trasplantes en ratas, se ha reportado que a las 8 semanas postrasplante la sobrevivencia celular es inconsistente con pocas células cromafines remanentes, pero

existe disminución significativa del giro inducido por apomorfina y anfetaminas (Becker y cols., 1990b).

La medición de las cantidades de dopamina en el núcleo caudado de animales transplantados y sin transplantar (Freed, 1983; Freed y cols., 1983) y el registro de la respuesta por estimulación con anfetaminas (Becker y Freed, 1988a) han sugerido el acceso al núcleo caudado de las catecolaminas liberadas por los trasplantes de médula adrenal colocados ventricularmente. Se ha encontrado que el líquido cerebroespinal de las ratas con estos trasplantes presenta concentraciones importantes de noradrenalina y adrenalina, así como cantidades detectables de dopamina (Becker y Freed, 1988b; Becker y cols., 1990a) y sus metabolitos (Becker y cols., 1990a), lo cual coincide con la disminución de la conducta de giro inducida (Becker y cols., 1990b; Takashima y colaboradores, 1992). Ante la polémica de cómo llega la dopamina a la zona donde es necesaria, se ha propuesto que ésta viaja a través de los vasos sanguíneos y difunde hacia los receptores en el estriado (Becker y Freed, 1988b).

Los trasplantes de médula adrenal colocados en el parénquima del núcleo caudado denervado de dopamina, producen disminución de la conducta de giro pero su apariencia no es tan sana como los colocados en el ventrículo lateral, presentando mayor cantidad de células necróticas (Becker y cols., 1990a) y fragmentación de la matriz extracelular, por disminución de la cantidad de moléculas de adhesión (Poltorak y Freed, 1990). Sin embargo mediante el trasplante de la médula adrenal en el estriado Nishino y colaboradores (1988) reportan la neurogenización de las células cromafines 10 meses después del trasplante, acompañada de la disminución significativa de la conducta de giro sobre todo cuando las células presentaban mayor cantidad de neuritas y ramificaciones.

Este tipo de trasplantes tiende a reducir la conducta de giro inducida, aún en los casos en que el giro no alcanza decrementos significativos (Freed y cols., 1986; Nishino y cols., 1988). Existen reportes que evidencian la sobrevivencia de los trasplantes colocados en el parénquima estriatal, sin estar en contacto con el ventrículo (Murphy y Sturm, 1923; Kelly y cols., 1975; Das y cols., 1979; Fink y Smith; 1980). Sin embargo las

tasas de sobrevivencia se reportan en rangos que van del 1 al 5% (Brundin y cols., 1985; 1986; Patel-Vaidya y cols., 1985; Stromberg y cols., 1985).

Comparando la zona en que el trasplante pueda tener efectos funcionales más satisfactorios Nishino y colaboradores (1986a) y Heim y colaboradores (1993), en forma independiente, transplantaron sustancia nigra fetal en el ventrículo lateral o en el parénquima estriatal de roedores depletados de dopamina. Los resultados de ambos reportes sugieren que la recuperación funcional depende del desarrollo y ramificación de las células transplantadas, y que éste a su vez se relaciona con la localización del trasplante, de tal forma que existe mayor recuperación funcional cuando el trasplante es colocado en el ventrículo.

Con el mismo objetivo Torigoe y colaboradores (1989) compararon el efecto funcional de la inyección de médula adrenal en el ventrículo lateral o en el parénquima del núcleo caudado en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, encontrando sobrevivencia en ambos tipos de trasplante con resultados ligeramente mejores respecto a la recuperación funcional cuando el tejido se colocó en el parénquima del estriado, desafortunadamente no hacen el reporte morfológico del estado de las células catecolaminérgicas.

Volumen del trasplante, sobrevivencia celular y efecto funcional de los trasplantes dopaminérgicos en el modelo experimental y la enfermedad de Parkinson.

Como se ha mencionado uno de los factores más importantes para favorecer el efecto funcional de los trasplantes de células catecolaminérgicas en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, es la sobrevivencia del trasplante y sobre todo la existencia de células inmunorreactivas a TH. Bajo esta lógica en algunos experimentos se ha reportado la sobrevivencia celular y/o el volumen del trasplante, y su relación con el efecto funcional sobre las alteraciones conductuales. En ratas con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, el trasplante de tejido del mesencéfalo fetal en suspensión colocado intraestriatalmente induce la disminución del giro ante la aplicación de anfetamina, pero sólo en animales que al ser sacrificados

mostraron sobrevivencia de más de 400 células inmunoteñidas a TH (Nishino y cols., 1990). El análisis estructural de estas células reveló el establecimiento de sinapsis con el cerebro anfitrión independientemente del tiempo postransplante al que fueron observadas - 3 meses, 1 o 2 años- teniendo una sobrevivencia promedio de entre 605 ± 120 a 750 ± 100 células sin diferencias significativas entre grupos. Siguiendo el mismo método Vuillet y colaboradores (1994) mostraron la sobrevivencia de células con inmunorreacción a TH y con forma redonda, triangular o multipolar, con somas de 1150 a $1254 \mu\text{m}^2$. Mediante microscopía electrónica, se observó la formación de sinapsis entre estas células y células del tejido anfitrión.

Buscando la relación entre la disminución del giro inducido, la sobrevivencia de las células implantadas y el volumen del transplante, Sauer y colaboradores (1992) reportan que 40 días después de los trasplantes de tejido mesencefálico fetal, la sobrevivencia de células inmunoteñidas a TH fue de 2433 ± 203 células contenidas en trasplantes que conservaron en promedio un volumen de $0.88 \pm 0.11 \text{ mm}^3$. El número de células fue superior a los registrados en trasplantes de tejido en suspensión, con 1032 ± 224 células y volumen de $0.25 \pm 0.05 \text{ mm}^3$. Cabe señalar que el volumen transplantado inicialmente fue de $4 \mu\text{l}$ en ambos grupos por lo tanto el volumen final, aún en el mejor de los casos, fue menor a la cuarta parte del total.

En monos tratados bilateralmente con MPTP, 30 días después de recibir el transplante autólogo de tejido de la médula adrenal colocado intraparenquimamente Hansen y colaboradores (1988) reportan la sobrevivencia de 20 células inmunorreactivas a TH en sólo dos de los 7 monos transplantados, de un total de 250 000 células injertadas por animal. En monos con lesión unilateral, Kordower y colaboradores (1990) realizaron trasplantes autólogos de médula adrenal colocando el tejido en la cabeza del núcleo caudado y en el putamen ipsilaterales. Sacrificaron a los animales 3 meses después, encontrando que cuando el transplante se localizó en el parénquima estriatal la sobrevivencia varió entre 8,736 y 18,516 células y cuando el tejido quedó implantado intraventricularmente la sobrevivencia de células cromafines fue de 30,192 a 54,312 células. Cabe aclarar que no hubo relación entre el número de células localizadas en el

caudado y el número de células encontradas en el ventrículo cuando se presentaron las dos situaciones en un mismo animal.

Parece ser que un factor importante en la sobrevivencia del tejido mesencefálico es la distribución del volumen total del trasplante. Nikkhah y colaboradores (1994) reportaron que después de 4 meses de haber inyectado 450,000 células distribuidas como macrodepósitos - dos depósitos con 1.8 μ l de tejido- o en microdepósitos - 6 depósitos con 0.2 μ l de tejido cada uno- en el caudoputamen, en los microtransplantes, el volumen ocupado por los trasplantes fue 1.83 \pm 0.3 mm³, y la sobrevivencia fue de 5608 \pm 624 células inmunorreactivas a TH, mientras que en los macrotransplantes el volumen del trasplante fue de 1.064 \pm 0.076 mm³ y el número de células inmunorreactivas sobrevivientes fue de 1996 \pm 36, sobrevivencia 2.8 veces mayor en los microtransplantes los cuales presentaron una mayor extensión de fibras, adjudicando este efecto al mayor contacto en los microdepósitos entre el tejido transplantado y el caudado anfitrión. Mediante la microdiálisis se encontró una relación directamente proporcional, entre el incremento de dopamina en el caudado denervado con el volumen del trasplante y el número de células inmunorreactivas a TH contenidas en éste. Considerando el número de células y los volúmenes iniciales es fácil observar que la mejor sobrevivencia se presenta en los microtransplantes. Sin embargo, proporcionalmente, el volumen de tejido sobreviviente representa cerca del 50% del volumen del tejido implantado y el número de células reportadas equivale aproximadamente al 1.25% de células implantadas, lo que ejemplifica las escasas probabilidades que tienen las células y el tejido para sobrevivir al ser transplantados.

Con la implantación de tejido proveniente de mesencéfalo fetal al ventrículo ipsilateral de ratas depletadas unilateralmente de dopamina estriatal, se ha reportado que después de implantar 3.3 μ l de tejido en bloque la sobrevivencia celular en el trasplante, a las 12 semanas, es de 325 \pm 105 células inmunorreactivas a TH, mientras que en los trasplantes donde se emplea tejido disociado el número de células inmunorreactivas fue de 218 \pm 67 (Heim y cols., 1993).

El trasplante intracaudal de 10 μ l de médula adrenal en suspensión proveniente

de ratas jóvenes o de ratas viejas, presenta la sobrevivencia de 200 ± 88 células por trasplante sin diferencias entre ambos grupos, aunque sólo en los animales trasplantados con células extraídas de organismos jóvenes se disminuyó el giro inducido (Freed y cols., 1986).

Los trasplantes de tejido dopaminérgico en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, pueden revertir las alteraciones motoras. Sin embargo, una de las limitantes importantes en el uso del tejido catecolaminérgico para ser trasplantado al sistema nervioso, es la alta mortalidad que afecta al tejido implantado.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue el de establecer la correlación entre la sobrevivencia, el sitio de implantación y los efectos funcionales de los trasplantes de médula adrenal fetal colocados ipsilateralmente en el estriado o ventrículo lateral en ratas con denervación unilateral de la vía nigroestriatal.

HIPOTESIS

Como ya se observó varios reportes señalan que en el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson la mejor conservación del tejido trasplantado resulta en un efecto funcional más pronunciado, y se sabe que el ventrículo lateral es la zona donde se presenta una mejor sobrevivencia celular, por lo tanto se espera que al colocar el tejido proveniente de la médula adrenal fetal en el ventrículo lateral de ratas con depleción unilateral de la dopamina estriatal habrá mayor conservación del tejido trasplantado y la disminución del giro inducido por apomorfina será más eficiente.

METODO:

Se emplearon 26 ratas macho de la cepa Wistar que al inicio del experimento pesaban entre 180 y 200 gramos, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio con ciclos de luz-obscuridad de 12 hrs., con libre acceso a la comida y al agua.

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35mg/kg i.p.) y por métodos estereotáxicos se realizó la lesión unilateral del haz medial del cerebro anterior inyectando 4 μ l de solución salina con 0.2 mg de ácido ascórbico y 8 μ l de 6-hidroxidopamina, por un período de 5 minutos. Las coordenadas utilizadas fueron: anteroposterior: -4 mm y lateral: 1.4 mm a partir de bregma, y vertical: -7.7mm a partir de las meninges (de acuerdo a Paxinos y Watson, 1986). Con el propósito de evaluar el grado de denervación dopaminérgica se registró la conducta de giro inducida por apomorfina (0.25 mg/kg i.p.) en las semanas 2 y 4 después de la lesión. Para ser transplantadas se emplearon únicamente aquellas ratas que mostraron 200 o más giros durante un período de 30 minutos de observación.

Un mes después de la lesión los animales fueron nuevamente anestesiados para la implantación del tejido obtenido de la médula adrenal de fetos con 17-18 días de gestación. Después de la disección del tejido, éste fue succionado al interior de una micropipeta de vidrio acoplada a una microjeringa Hamilton de 10 μ l. Inmediatamente después se introdujo la punta de la micropipeta de vidrio en el área elegida y fue inyectado el tejido, dejando la pipeta en la zona por espacio de dos minutos y retirándose lentamente. Con los animales lesionados se formaron tres grupos de acuerdo a los siguientes procedimientos de implantación: Grupo ventrículo (n=9) - se le inyectó 1 μ l de tejido al ventrículo lateral ipsilateral a la lesión, con las coordenadas 0.2 mm anteroposterior y 1.3 mm lateral partiendo de bregma y -4.8 mm vertical a partir de meninges.

Grupo Caudado 1(n=8) - al cual se inyectó 1 μ l de tejido en el parénquima del núcleo caudado ipsilateral a la lesión con las coordenadas 0.2 mm anteroposterior y 3 mm lateral

partiendo de bregma y -6.3 mm vertical a partir de meninges.

Grupo Caudado 5 (n=9) - en el que se inyectaron 5 μ l de tejido en el parénquima del núcleo caudado ipsilateral empleando las mismas coordenadas que el grupo anterior.

Cabe aclarar que al inicio del experimento se tenía contemplado un cuarto grupo en el que se inyectarían 5 μ l de médula adrenal en el ventrículo lateral ipsilateral a la lesión, pero al realizarse un estudio piloto se encontró que los animales transplantados bajo estas condiciones no sobrevivían, probablemente debido al bloqueo del ventrículo por el excesivo volumen del trasplante, por lo cual se descartó dicho grupo.

Durante las semanas 2, 4, 6 y 8 después del trasplante se evaluó la conducta de giro mediante la aplicación de apomorfina (0.25 mg/kg i.p.); realizándose cada vez el registro de la conducta durante 30 minutos, para poder comparar el número de giros dados por cada animal antes y después del trasplante. La conducta de giro se representa en los resultados como porcentaje de cambio, el cual se obtuvo tomando como base (100%) el promedio de giros dados en las dos evaluaciones pretrasplante y comparando con el número promedio de giros registrados en las 4 evaluaciones posteriores al trasplante.

Pasados dos meses del trasplante los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron por vía intracardiaca pasando 200 ml de solución salina (9%, p.H. de 7.4) y fijando con 300 ml de paraformaldehído (al 4% en buffer fosfatos, 0.1 M., p.H. de 7.4). Una vez perfundidos los animales, se extrajeron los cerebros y se colocaron en el mismo fijador durante 2 horas. Posteriormente se realizaron cortes de 50 micras en un vibratomo, recogiendo todos los cortes donde aparecía el tejido transplantado; así como algunos cortes en la zona de la sustancia nigra compacta, los cuales se emplearon para comprobar la pérdida de células dopaminérgicas como efecto de la aplicación de la neurotoxina. Todos los cortes se procesaron convencionalmente para inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), con la intención de identificar las células catecolaminérgicas en el área del trasplante y en la sustancia nigra. El procedimiento utilizado fué el siguiente: se lavaron los cortes tres veces con buffer PBS (0.1 M, p.H. 7.4), inmediatamente después los cortes se lavaron con buffer TRIS (0.1 M,

p.H. 7.4), durante 10 minutos con agitación. Los cortes se mantuvieron en buffer TRIS que contenía 3% de suero normal de cabra y 0.3% de triton X-100 por una hora, con agitación constante. Posteriormente se incubó el tejido en el anticuerpo primario ANTI-TH (1:1000) diluido en buffer TRIS y 1% de suero normal de cabra durante tres días a 4 grados centígrados, utilizando cámara húmeda.

Pasado el tiempo establecido se lavaron los cortes tres veces, durante 10 minutos en cada ocasión, en buffer TRIS agregando 1% de suero normal de cabra. Posteriormente se incubó por una hora a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario ANTI IGg de conejo (1:2000) diluido en buffer TRIS y con 1% de suero normal de cabra, para después hacer otros tres lavados manteniendo los cortes en buffer TRIS, durante 10 minutos cada vez. Durante la hora posterior, los cortes permanecieron incubados a temperatura ambiente en Avidina-Biotina a una concentración del 0.06% diluida en el buffer TRIS, posteriormente los cortes fueron lavados durante 10 minutos, tres veces, en el buffer TRIS. Durante cada uno de los pasos se mantuvieron los cortes en agitación. Para revelar la tinción se pusieron los cortes en diaminobenzidina DAB (5:10 000) diluida en buffer TRIS durante 5 minutos aproximadamente y finalmente, se lavaron los cortes tres veces, durante 10 minutos en cada ocasión con el buffer TRIS.

Una vez revelada la inmunocitoquímica los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con resina. En cada corte se midió el área ocupada por el trasplante mediante un programa de análisis de imágenes computarizado acoplado a un microscopio óptico. Una vez obtenidas todas las áreas de un trasplante se sumaban y, considerando que los cortes del tejido cerebral tenían un grosor de 50 μm , se multiplicaba la suma de las áreas por 0.05 obteniendo así el volumen total del tejido transplantado por animal. Al volumen obtenido se le llamó *volumen de sobrevivencia*, ya que inicialmente se implantó 1 o 5 μl según el grupo y finalmente se localizó en el trasplante un menor volumen del tejido.

En cada uno de los grupos se midió el área del soma de 30 células inmunorreactivas a TH, elegidas al azar, empleando el programa de análisis de imágenes computarizado, esta medición fué con el fin de comparar el tamaño de las células

localizadas dentro de los trasplantes entre grupos. También se contaron de forma directa, empleando un microscopio de luz, todas las células inmunorreactivas a TH presentes dentro del área del trasplante en cada uno de los animales, con el fin de hacer la comparación del número de células entre los tres grupos experimentales.

Se comparó el número de giros entre grupos en las pruebas pretrasplante, con el objetivo de comprobar que inicialmente los grupos fueran homogéneos, aplicando la prueba T para muestras no pareadas. Posteriormente para observar el efecto del trasplante sobre la conducta de giro intragrupalmente se empleó una prueba T para muestras pareadas en la que se comparó el promedio de giros en las evaluaciones pre y postrasplante.

Para comparar entre grupos los cambios en la conducta de giro, el volumen del tejido postrasplante, el número de células inmunorreactivas a TH y el área del soma de tales células se empleó el análisis de varianza, que fue complementado, en los casos donde se presentaron diferencias significativas entre los grupos, con la prueba de Tukey.

RESULTADOS:

Cabe señalar que en la sustancia nigra compacta, de todos los animales empleados, las células inmunorreactivas a TH se veían en mayor cantidad en el lado contralateral a la lesión. En el lado ipsilateral a la lesión había algunas células remanentes con distribución preferente en el área medial (Fig. 1).

El análisis histológico reveló que los trasplantes colocados en ventrículo lateral presentaron con mayor frecuencia una forma redonda y compacta, con distribución preferente de las células inmunorreactivas a TH hacia el borde del trasplante. En general, los trasplantes eran grandes pero no ocupaban totalmente el ventrículo, y ocasionalmente se detectó deformación de éste (ver Figura 2).

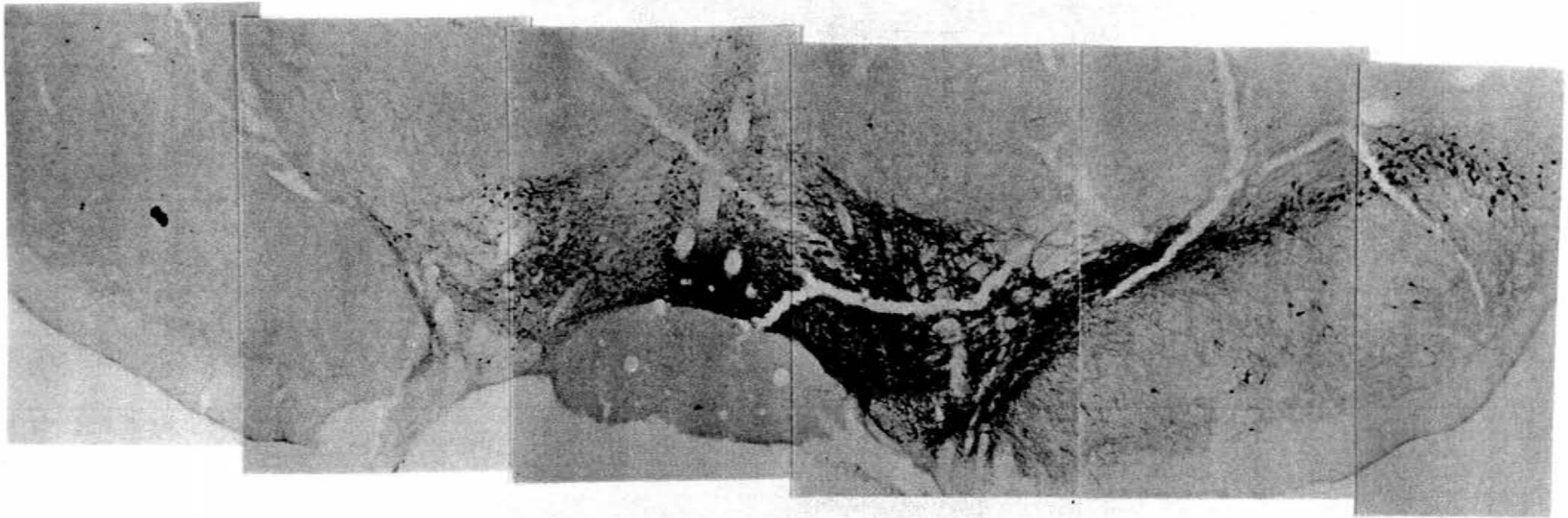
Dentro de los trasplantes se encontraron algunas células con fenotipo neurogenizado, es decir con somas que presentaban por lo menos una neurita independientemente del sitio de colocación. Este tipo de células fueron más comunes en los trasplantes colocados en el ventrículo lateral (Fig. 10 A,B y C).

Algunos trasplantes implantados en el parénquima estriatal mostraban forma redondeada sin embargo, la mayoría tenía forma alargada y algunas veces terminaban en forma de "gota" (Fig. 5 a 8). En este tipo de trasplante, las células inmunoteñidas se encontraban con mayor frecuencia en las zonas centrales del trasplante.

ASPECTOS MOTORES.

Al inicio del experimento se comparó el desempeño de los animales de cada grupo para verificar que fueran homogéneos y se encontró que en las evaluaciones pretrasplante no hubo diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$).

Respecto al efecto de los trasplantes de médula adrenal sobre la conducta de giro inducida con apomorfina, nuestros resultados muestran que los tres grupos presentaron una disminución similar, alcanzando en todos los casos porcentajes de cambio no significativos ($p > 0.05$) de cerca del -11% (Gráfica 1) independientemente del sitio de



500 μ m

Figura 1.- Microfotografía que muestra las células inmunoractivas a TH contenidas en la sustancia nigra compacta de una rata lesionada unilateralmente con la aplicación de la neurotoxina 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior. Se puede notar que en el lado ipsilateral a la lesión (Izquierdo) existen pocas células remanentes, localizadas en el área medial.

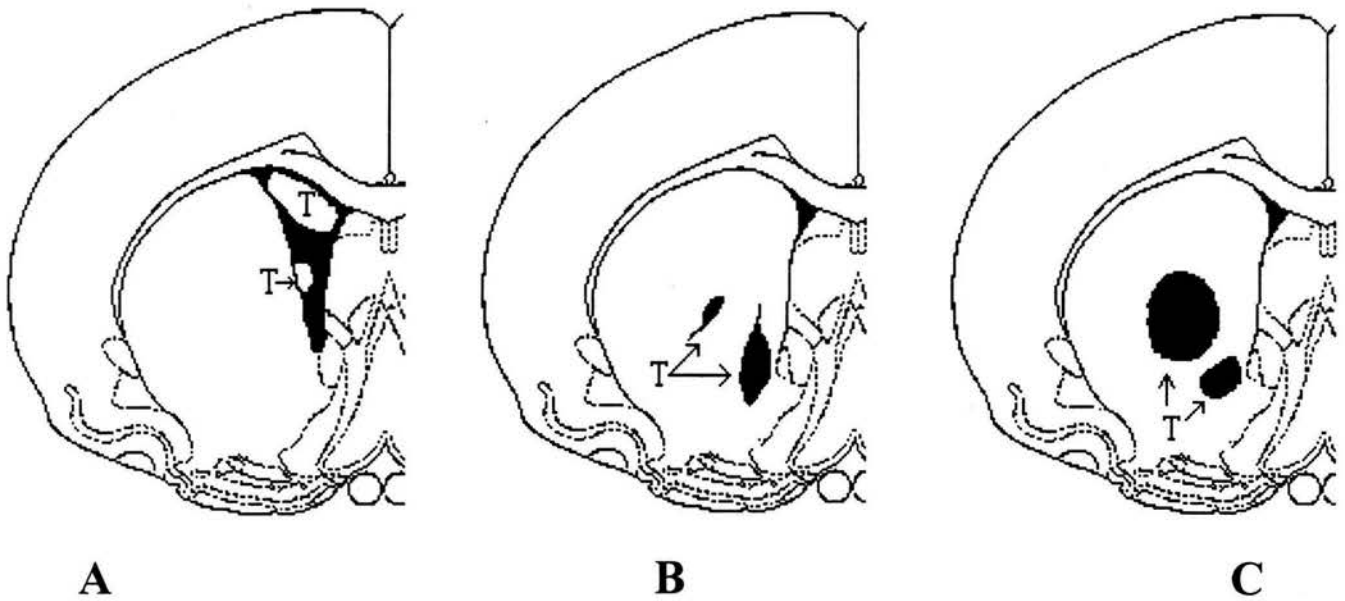
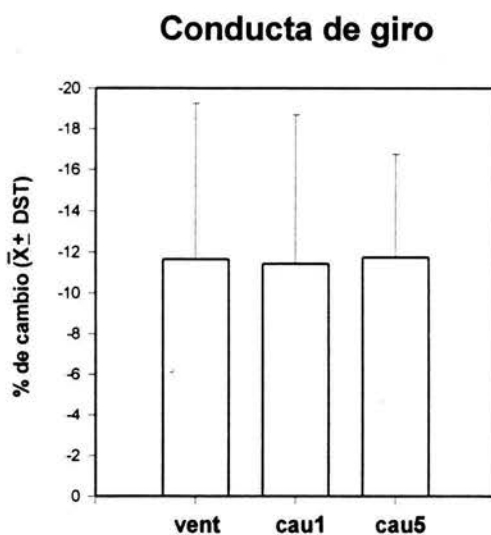


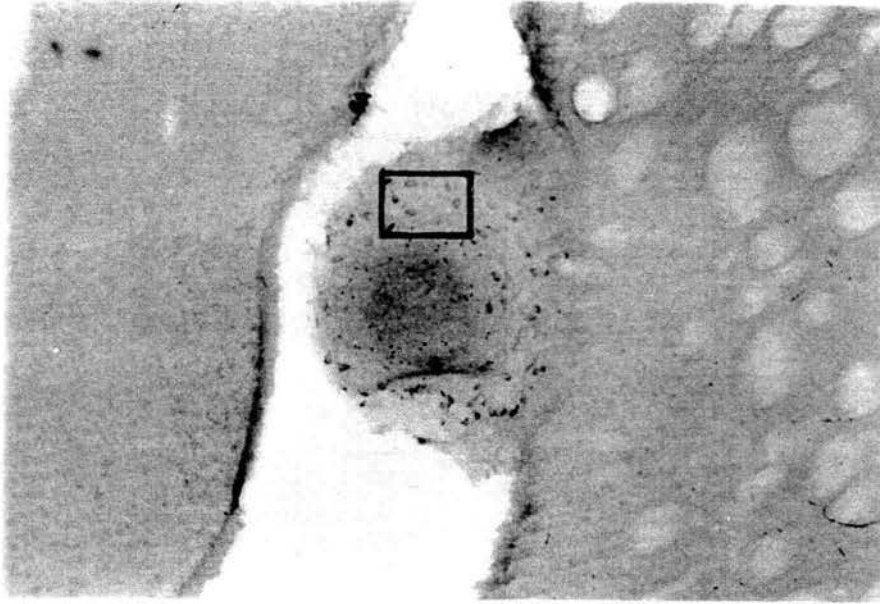
Figura 2.- En cada una de los dibujos se representa el área y la localización de dos de los transplantes (T) colocados ipsilateralmente a la lesión, observados dos meses postransplante. En A se esquematizan la posición y el tamaño de dos transplantes colocados en el ventrículo lateral, B y C muestran cada uno dos transplantes colocados en el caudado ipsilateral a la lesión, cuando se implantó $1\mu\text{l}$ (B) o $5\mu\text{l}$ (C) de médula adrenal. En todos los esquemas se presenta un caso en el que la conservación del tejido fue buena y un caso en que hubo pobre conservación del mismo.

colocación o volumen del trasplante. Los porcentajes de cambio se obtuvieron comparando el número promedio de giros (200 o más), dado por los animales de cada grupo, antes del trasplante con el número promedio de giros registrados en las evaluaciones postrasplante, lo cual nos muestra el efecto del trasplante sobre la conducta de giro inducida. El grupo que recibió 1 μ l de tejido en el ventrículo lateral mostró una disminución en el giro del -11.67%, el grupo con trasplante de 1 μ l de médula adrenal en el parénquima estriatal presentó un porcentaje de cambio del -11.43%, y el grupo con 5 μ l de tejido transplantado en parénquima estriatal alcanzó un -11.75%. Cabe señalar que las diferencias intra y entre grupos no fueron significativas ($p > 0.05$).



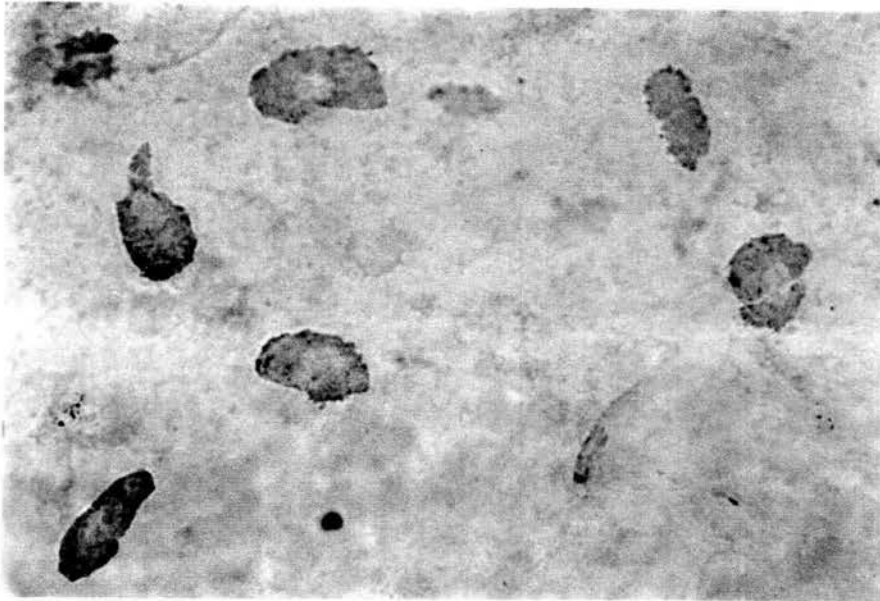
Gráfica 1. Se muestra la media global del porcentaje de cambio de las evaluaciones de la conducta de giro, después de la aplicación de apomorfina (0.25 mg/Kg. i.p.). Como se puede observar los tres grupos presentan disminución del giro inducido después del trasplante en cerca del 11%, no presentándose diferencias estadísticamente significativas. vent.= grupo transplantado con 1 μ l de médula adrenal inyectada en ventrículo lateral (n=9), cau1= grupo transplantado con 1 μ l de tejido intracaudalmente (n=8), cau5= grupo transplantado intracaudalmente con 5 μ l de tejido (n=9).DST= Desviación estandar.

A



250µm

B



25µm

Figura 3.- **A** Microfotografías de uno de los transplante de médula adrenal que después de 2 meses de haber sido colocado en el ventrículo lateral conservó poco volumen del tejido. **B** es un acercamiento al recuadro señalado en la microfotografía **A**, se pueden observar las células inmunorreactivas a TH localizadas dentro del transplante, que son de mayor tamaño que las células localizadas en los transplantes intraestriatales.

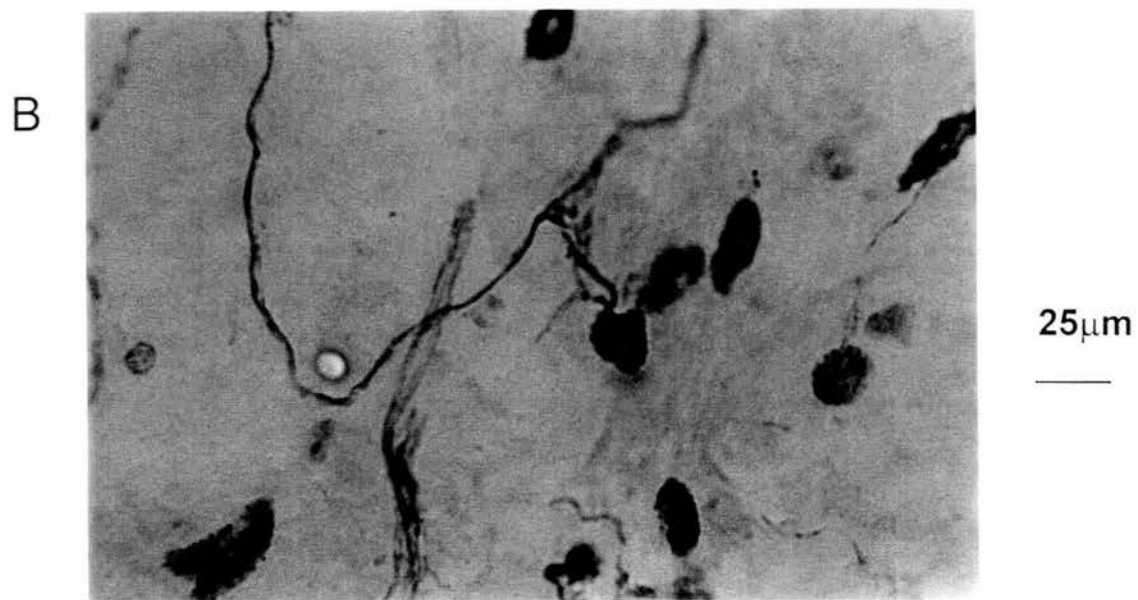
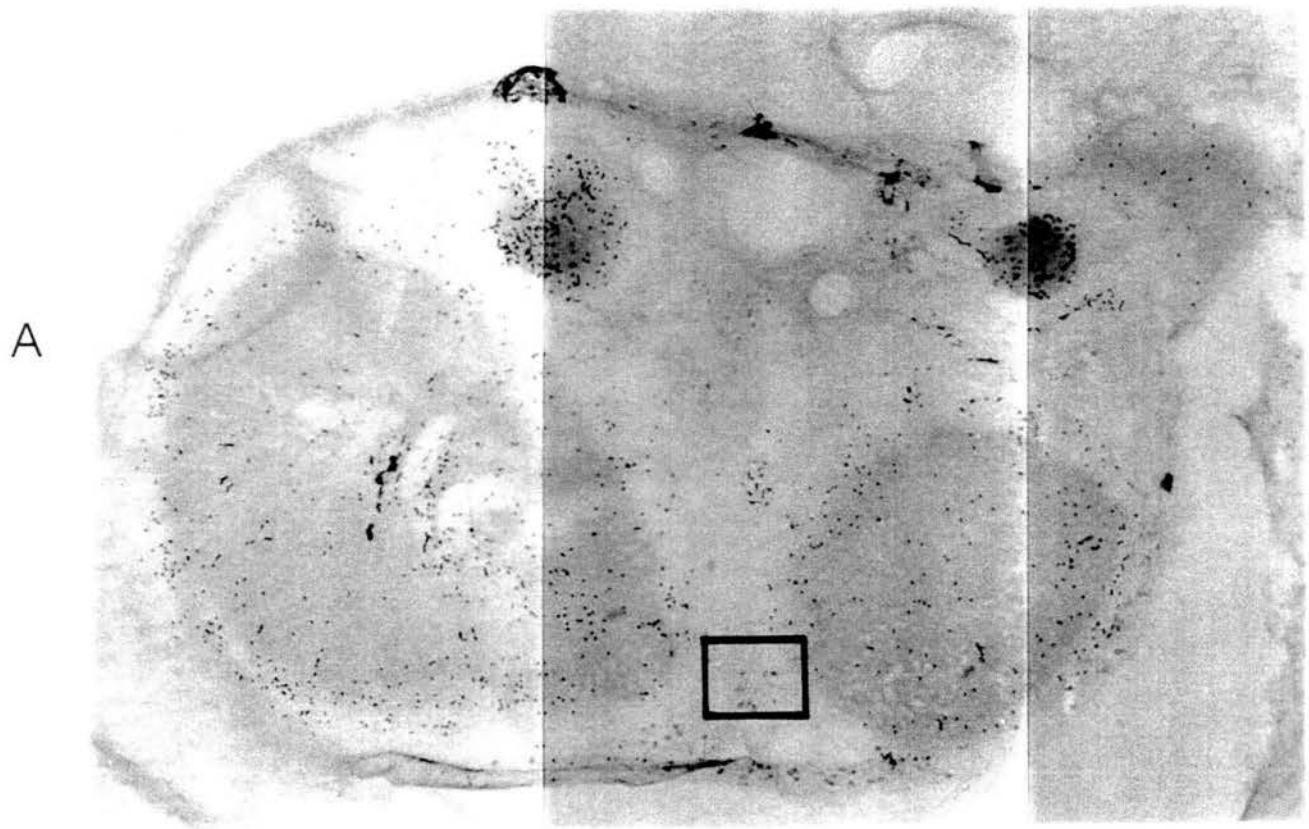
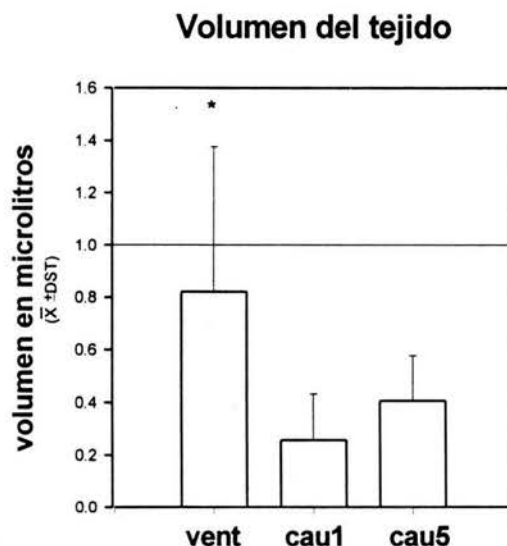


Figura 4.- Microfotografías de un transplante colocado en el ventrículo lateral, en **A** se puede observar la buena conservación del tejido (comparar con la figura 3A). **B** muestran algunas células inmunorreactivas a TH localizadas en el recuadro marcado en **A**.

VOLUMEN DEL TRANSPLANTE.

La estimación del volumen del tejido transplantado reveló que el grupo en el que se implantó $1\mu\text{l}$ de tejido en el ventrículo lateral presentó el mayor volumen de tejido remanente con una media de 0.82 ± 0.55 microlitros por rata (Fig. 3 y 4). Para los grupos con transplante en el parénquima estriatal se encontró que, en el grupo implantado con $1\mu\text{l}$ de médula adrenal el volumen promedio de sobrevivencia de tejido sólo alcanzó 0.256 ± 0.17 microlitros siendo el promedio menor (Fig. 5 y 6), mientras que en el grupo transplantado con $5\mu\text{l}$ de médula adrenal el volumen promedio fue de 0.406 ± 0.17 microlitros (Fig. 7 y 8). Las diferencias encontradas son estadísticamente significativas ($F_t=3.42$, vent vs cau1, cau5, $F=6.35$, $p<0.05$) al comparar el grupo con transplante colocado en el ventrículo lateral con los dos grupos con transplante depositado en el parénquima estriatal, sin importar el volumen inicial del transplante -entre estos últimos dos grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas - (Gráfica 2).



Gráfica 2. Se muestra en cada grupo, el volumen del tejido sobreviviente a las 4 semanas postransplante. Se observa que para el grupo transplantado en ventrículo lateral (vent) el volumen encontrado fue de $0.82\mu\text{l}$, mientras que para los dos grupos transplantados en parénquima estriatal (cau1 y cau5) el volumen encontrado fué de 0.256 y $0.406\mu\text{l}$ respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo vent y los grupos cau1 y cau5 ($*p<0.05$). DST=Desviación estandar.

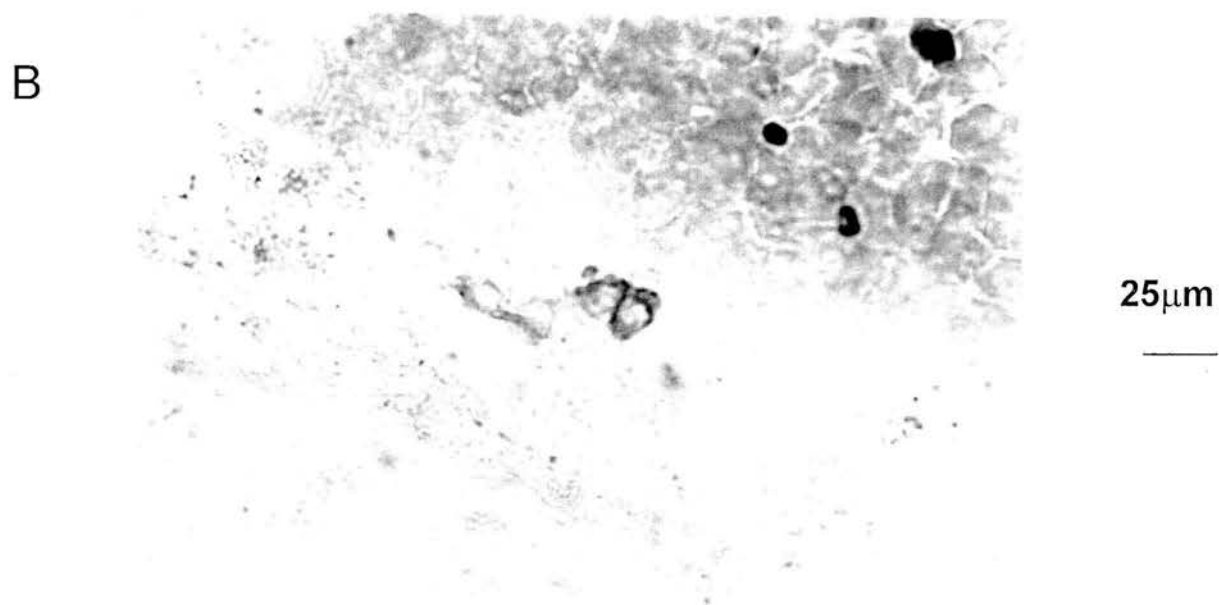
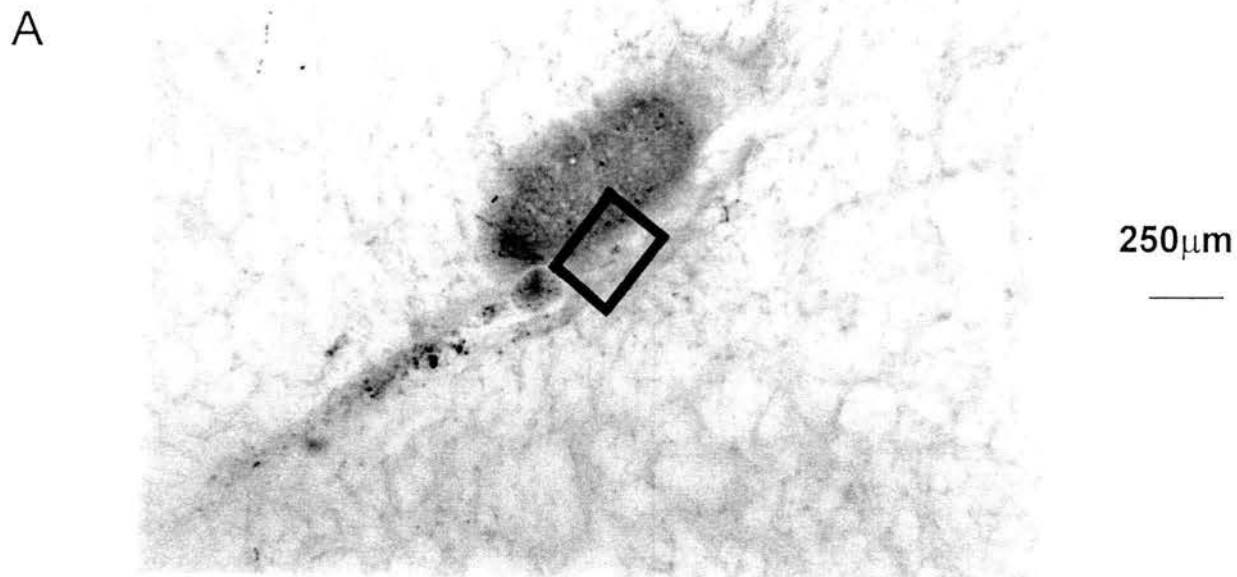


Figura 5.- **A** Microfotografías que muestran un transplante de 1μ l de la médula adrenal, colocado en el parénquima estriado con escaso volumen de tejido sobreviviente, se muestra la ubicación del tejido transplantado dentro del estriado; la distribución del tejido, en forma de "gota", es característica de este tipo de transplantes. **B** es un acercamiento al recuadro marcado en la microfotografía **A**, se aprecian algunas células inmunoteñidas a TH dentro del transplante, las cuales se localizan en menor cantidad y son de menor tamaño que las células localizadas en los transplantes intraventriculares (compárese con la figura 3B y 4B).

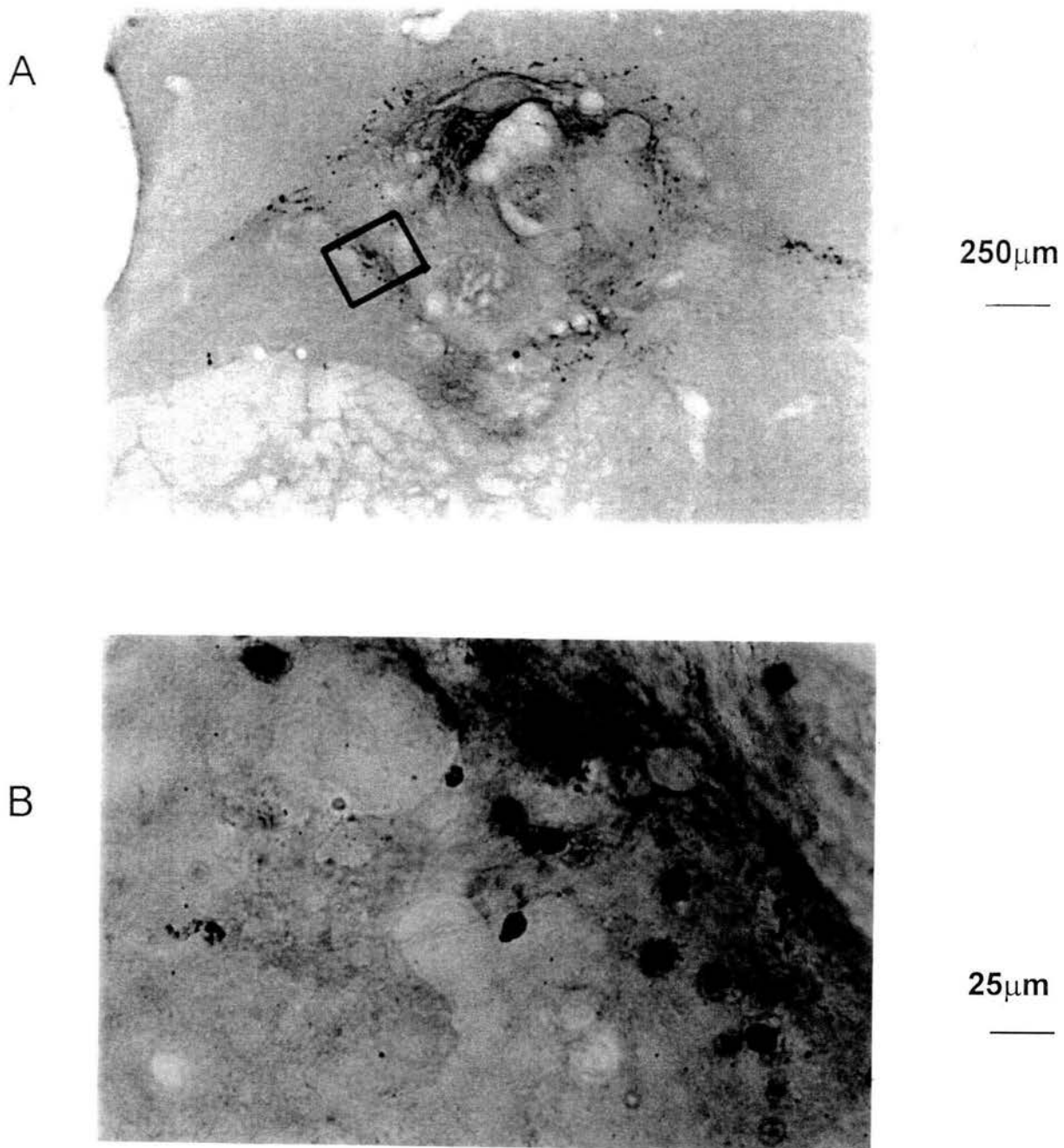
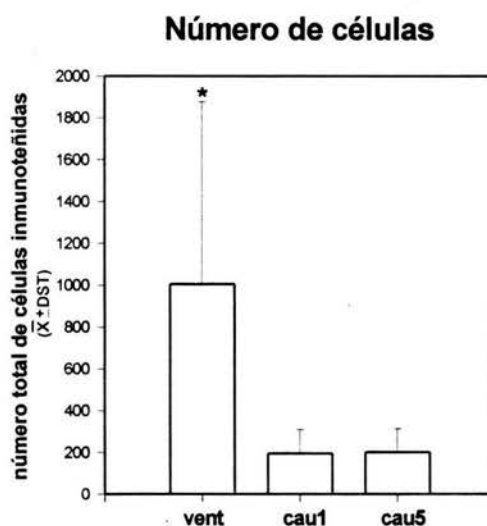


Figura 6.- Microfotografías que ejemplifican el tamaño de uno de los trasplantes estriatales de $1\mu\text{l}$ de tejido proveniente de la médula adrenal con mayor conservación del volumen del tejido. En **A** se muestra la ubicación del tejido transplantado en el estriado, el recuadro en la figura corresponde al acercamiento que se muestra en **B**. En **B** se aprecia algunas células inmunoteñidas a TH localizadas alrededor del tejido transplantado, son menos abundantes que en los trasplantes intraventriculares y de menor tamaño (compárese con la figura 3B y 4B).

SOBREVIVENCIA CELULAR.

Mediante la inmunocitoquímica para detectar la presencia de la tirosina hidroxilasa, se realizó el conteo del número total de células teñidas presentes dentro del tejido transplantado. Los resultados muestran que el grupo con el trasplante colocado en el ventrículo lateral presentó el mayor número de células inmunoteñidas, con un promedio de 1005.4 ± 113.7 células por trasplante (Fig. 3B y 4B). En los grupos con el trasplante dentro del parénquima, la sobrevivencia de células inmunorreactivas fue menor, de tal forma que en el grupo implantado con $1 \mu\text{l}$ de médula adrenal la media del número de células fue de 194.6 ± 115 (Fig. 5B y 6B) y en el grupo transplantado con $5 \mu\text{l}$ de médula adrenal se obtuvo una media de 200.4 ± 113.7 células (Fig. 7B y 9; Gráfica 3). La diferencia en el número de células al comparar el grupo con trasplante en el ventrículo lateral con cada uno de los dos grupos con trasplante colocado en parénquima estriatal fue estadísticamente significativa ($F_t=3.42$, vent vs cau1, cau5, $F=7.87$, $p<0.05$), entre estos últimos no hubo diferencias significativas .



Gráfica 3. Se muestra la media del número total de células inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa presentes en los trasplantes de cada uno de los grupos. El grupo con mayor número de células por trasplante fue el grupo transplantado en el ventrículo lateral (vent) con 1005.4 ± 113.7 . Los otros dos grupos obtuvieron un número de células significativamente menor ($p<0.05$), siendo de 194.6 ± 115 células para el grupo transplantado con $1 \mu\text{l}$ de médula adrenal en parénquima estriatal (cau1), y 200.4 ± 113.7 para el grupo transplantado con $5 \mu\text{l}$ de médula adrenal en parénquima estriatal (cau5), no hubo diferencias significativas entre estos grupos. * = $p<0.05$ VS grupo. cau1 y grupo cau5. DST=Desviación estandar.

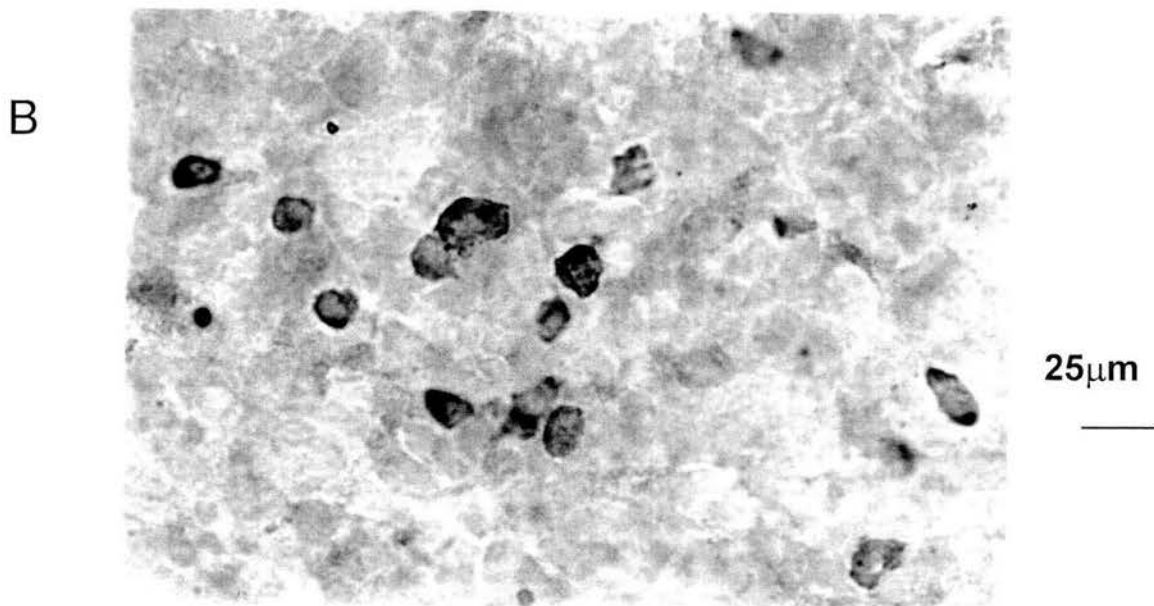
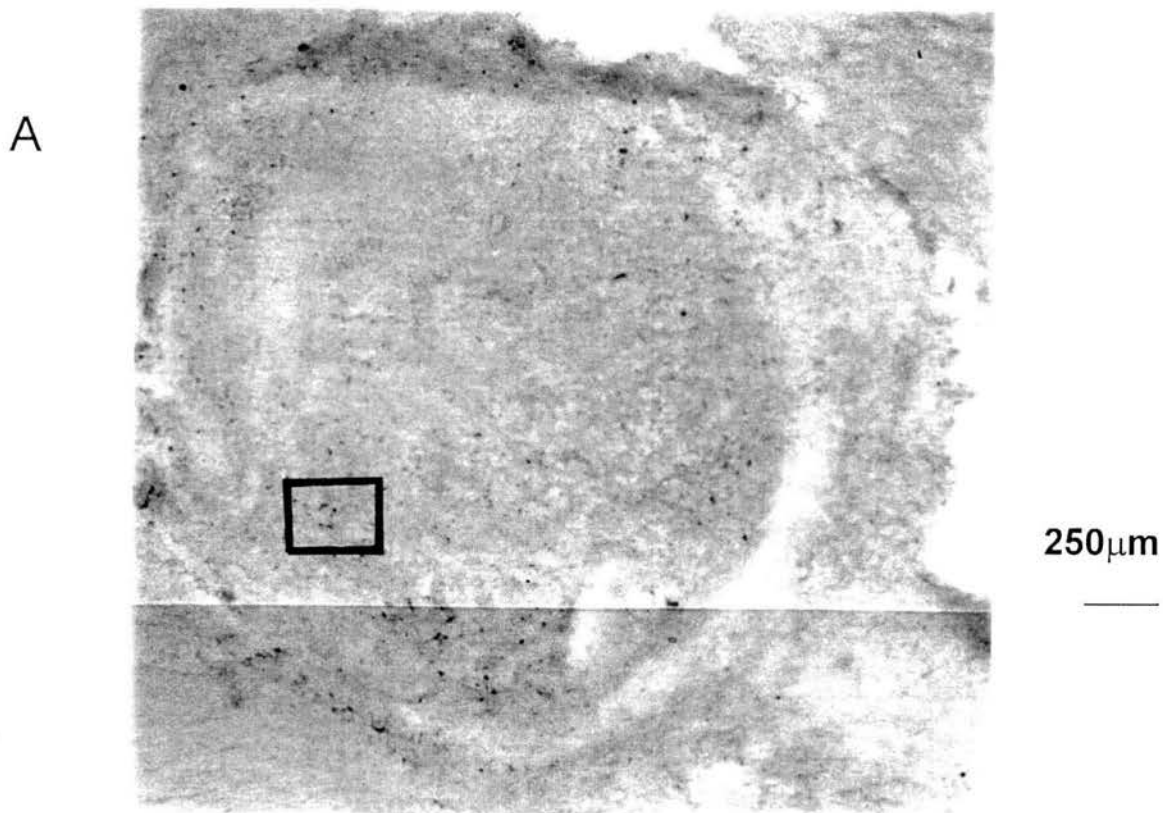


Figura 7.- Microfotografías de uno de los trasplantes de 5 μ l de tejido de la médula adrenal colocado en el parénquima estriatal con poco tejido sobreviviente. En **A** se muestra la apariencia del tejido transplantado en el estriado. **B** corresponde al recuadro señalado en **A**, se pueden ver algunas células inmunoteñidas a TH, que son menos abundantes y de menor tamaño que las células localizadas en los trasplantes intraventriculares (compárese con la figura 3).

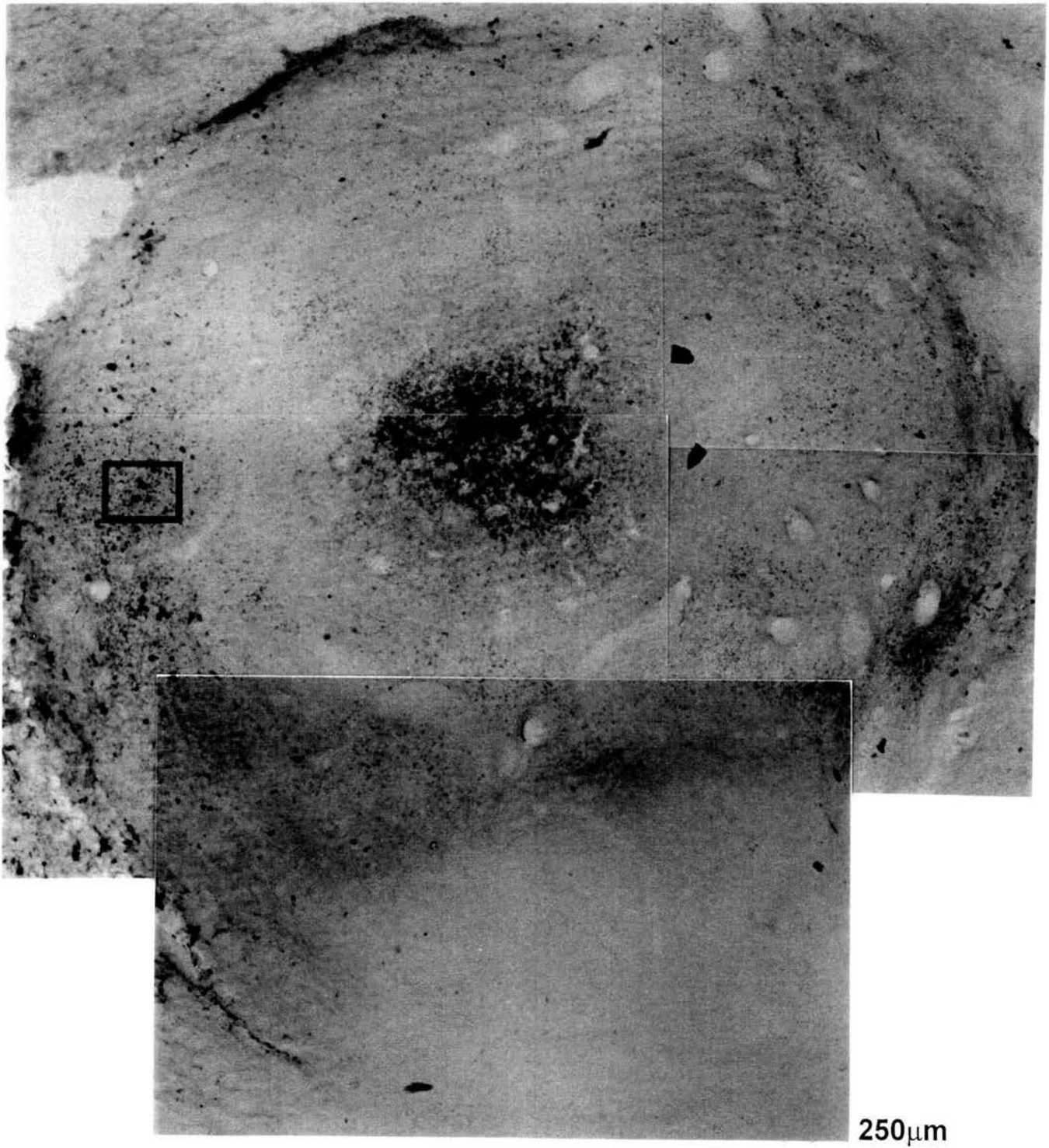
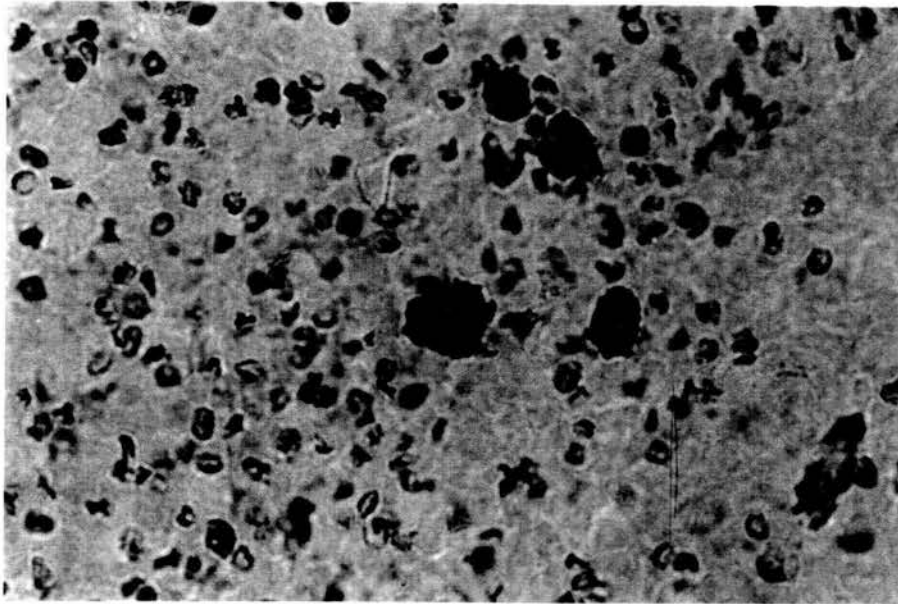


Figura 8.- Microfotografía ejemplificando el tamaño de uno de los trasplantes intraestriatales de $5\mu\text{l}$ de médula adrenal con mayor conservación del volumen del tejido (compárese con las figuras 3 y 4).



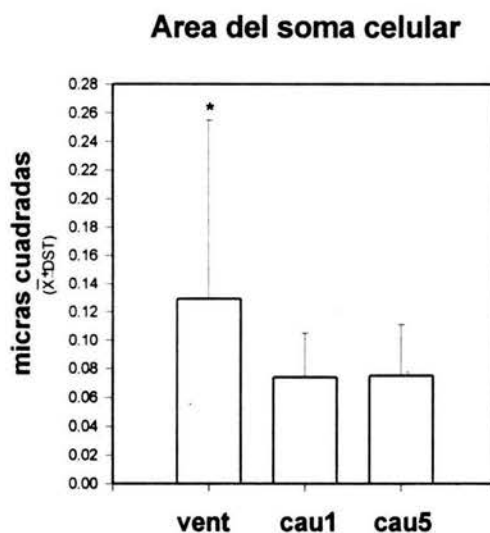
25 μ m



Figura 9.- Microfotografía del acercamiento al trasplante intraestriatal marcado en la figura 8. se aprecian algunas células inmunoteñidas a TH localizadas alrededor del tejido transplantado, que son de menor tamaño que las células localizadas en los trasplantes intraventriculares (comparar con la figura 3B y 4B).

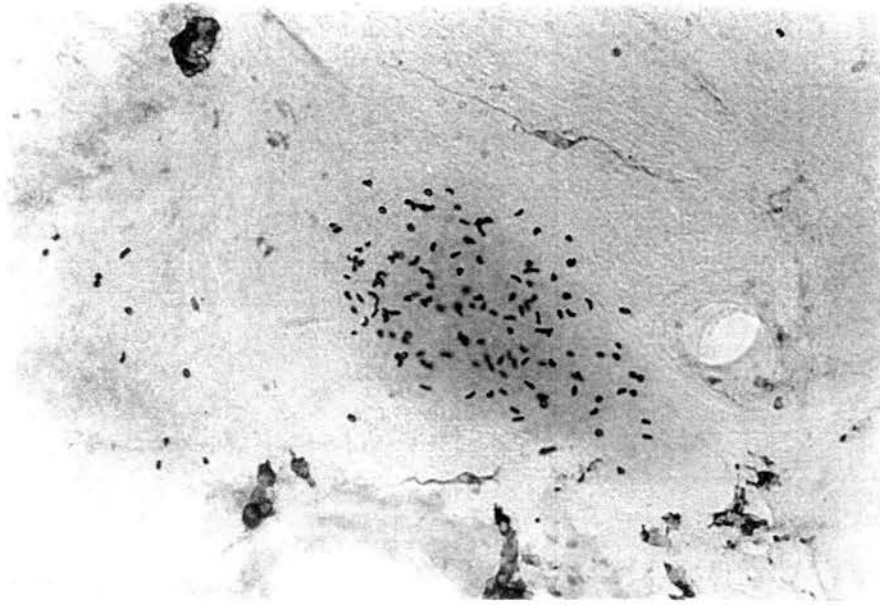
AREA DEL SOMA CELULAR.

En cada uno de los grupos, se midió el área del soma de 30 células ubicadas en el interior del trasplante y que presentaban inmunotinción a tirosina hidroxilasa. Las mediciones indican que en el grupo con trasplante colocado en el ventrículo lateral, el tamaño promedio del soma fue mayor que en los otros grupos siendo de 0.129 ± 0.126 micras cuadradas (Fig. 3B y 4B), mientras que cuando el trasplante se colocó en el parénquima del núcleo caudado, el tamaño del soma fue estadísticamente menor (Ft=3.42, vent vs cau1, cau5, $F=4.82$, $p<0.05$) midiendo entre 0.074 ± 0.031 y 0.075 ± 0.036 micras cuadradas según correspondía al grupo implantado con $1 \mu\text{l}$ de médula adrenal (Fig. 5B y 6B) o al grupo transplantado con $5 \mu\text{l}$ de médula adrenal (Fig. 7B y 9). Entre estos grupos no hubo diferencias significativas (Gráfica 4).



Gráfica 4. Representa el área promedio (en micras cuadradas) de los cuerpos celulares. En cada grupo se midió el soma de 30 células inmunorreactivas a TH, elegidas al azar dentro del área del trasplante. Se encontró que los somas de las células de los trasplantes colocados en el ventrículo lateral (vent) fueron estadísticamente más grandes - 0.129 ± 0.126 micras cuadradas - ($p<0.05$) que los somas de células encontradas en trasplantes inyectados en el parénquima los cuales fueron de 0.074 ± 0.031 micras cuadradas para el grupo transplantado con $1 \mu\text{l}$ de tejido (cau1) y de 0.075 ± 0.036 micras cuadradas para el grupo transplantado con $5 \mu\text{l}$ de tejido (cau5). * = $p<0.05$ vs grupo cau1. y gpo. cau5. DST=Desviación estandar.

A



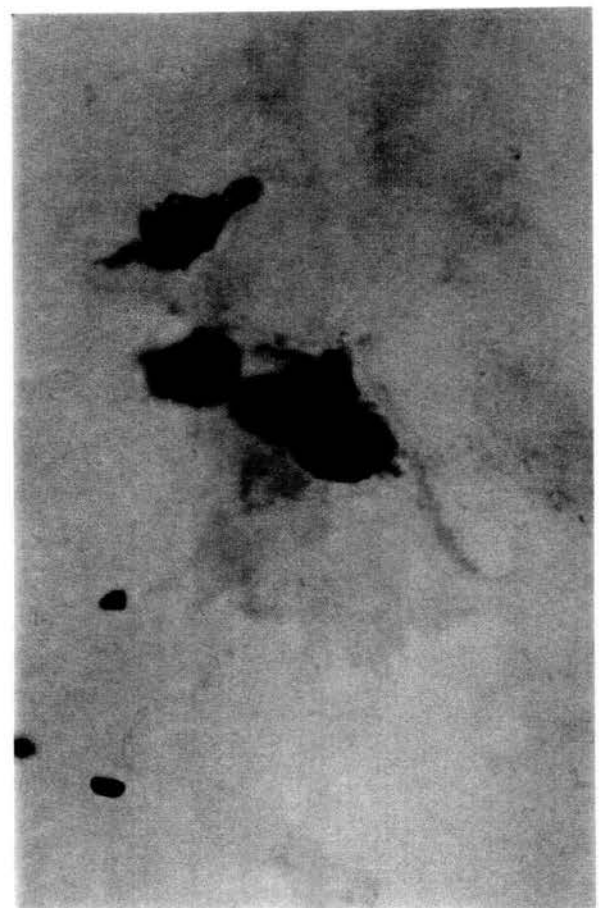
100μm

B



25μm

C



25μm

Figura 10.- Microfotografías de un transplante de médula adrenal colocado en el ventrículo lateral. En A se pueden observar varias células inmunorreactivas a TH con diferente morfología. En B se observa un acercamiento a una célula con dos prolongaciones, localizada dentro del tejido transplantado. En la figura C se observan algunas células redondas con inmunorreacción a TH, aspecto común entre las células inmunorreactivas en ambos tipos de transplantes -intraventriculares e intracaudales-.

DISCUSION

Es importante señalar que el hecho de colocar el tejido extraído de la médula adrenal fetal en el ventrículo lateral permite la conservación de un mayor volumen de tejido transplantado, además de que en esta condición se presenta el mayor número de células inmunorreactivas a TH con somas de mayor área en comparación con los trasplantes de médula adrenal fetal colocados en el parénquima del núcleo caudado. Cabe recordar que en los dos grupos en los que el trasplante fue colocado en el parénquima estriatal los volúmenes iniciales de tejido transplantado fueron de 1 y 5 μ l y que entre ellos no hubo diferencias significativas, en cuanto al volumen de tejido sobreviviente, número de células inmunorreactivas a TH y tamaño del soma de éstas.

A pesar de las diferencias señaladas, la disminución de la conducta de giro inducida por el agonista dopaminérgico apomorfina fue similar y sin cambios significativos entre los tres grupos al comparar los resultados de las evaluaciones previas contra las evaluaciones posteriores al trasplante. Lo que indica que en los animales empleados en este reporte el trasplante no tuvo efecto funcional independientemente de su localización y volumen.

Aspectos motores.

En este reporte se presentó una disminución, aunque no significativa, del giro inducido lo que corrobora lo señalado por varios autores quienes mencionan que el trasplante de tejido dopaminérgico en animales con el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson produce disminución en la conducta de giro inducida por apomorfina (Freed y cols., 1981; 1983; Jankovic y cols. 1989; Becker y cols., 1990a; 1990b; Takashima y cols., 1992).

En estudios previos se ha reportado la sobrevivencia de las células inmunorreactivas a TH colocadas en el ventrículo lateral o en el parénquima estriatal con resultados ligeramente mejores respecto a la recuperación funcional cuando el tejido se coloca en el estriado (Torigoe y cols., 1989). Desafortunadamente, en dicho reporte no se menciona el número de las células catecolaminérgicas localizadas en cada zona, dato

importante de conocer ya que la sobrevivencia celular se ha relacionado con la disminución de la conducta de giro (Björklund y cols., 1980; Nishimo y cols., 1986a; Bing y cols., 1988; Date y cols., 1993; Cunningham y cols., 1994).

Debido a la relación señalada respecto a que la mejor conservación del tejido transplantado resulta en un mayor efecto sobre la conducta de giro inducida, los resultados en el presente experimento, nos llevarían a pensar que el efecto conductual debería ser más pronunciado en los animales con transplante intraventricular. Sin embargo, hubo un efecto similar sobre la conducta de giro inducida por apomorfina entre los trasplantes colocados intraventricular e intraestriatalmente, y dicho efecto fue no significativo intra grupo y entre grupos, es decir el transplante no produjo cambios sobre la conducta de giro inducida.

Consideramos que la disminución significativa de la conducta de giro puede lograrse implantando el tejido intraestriatalmente, siempre y cuando se pueda incrementar el volumen final del transplante y el número de células inmunorreactivas a TH contenidas en él, ya que en este reporte la similitud en el efecto sobre la conducta de giro, puede deberse a que en los trasplantes colocados en el ventrículo lateral las catecolaminas liberadas desde éstos, se difundieron a través del líquido cerebroespinal llegando en cantidades mínimas al caudado, no siendo suficientes para reducir significativamente la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos (Rosenstein y Brightman, 1978; Freed y cols., 1981; Herrera-Marschitz y cols., 1984).

Otra especulación al respecto sería que el área del transplante sea importante para lograr el efecto funcional, de tal forma que siendo que el parénquima estriatal es la zona con deficiencia de dopamina y donde se localizan los receptores dopaminérgicos, el efecto benéfico de un transplante mal conservado con pocas células inmunorreactivas a TH puede ser semejante al efecto de un transplante mejor conservado con muchas células inmunorreactivas a TH pero que se localizan fuera del área denervada de dopamina, en este caso el ventrículo lateral.

Existe la posibilidad de que el área de contacto entre el transplante y el estriado receptor influya sobre el efecto funcional del transplante. Es decir que el efecto benéfico

del trasplante dependa del área de contacto, ya que en los trasplantes intraestriatales el área de contacto es mayor aún cuando el tamaño del trasplante es menor, en comparación con los trasplantes colocados intraventricularmente. Posibilidad remota ya que el efecto funcional fue similar y sin cambios significativos entre los tres grupos analizados en este reporte, independientemente de la zona de colocación y volumen de tejido encontrado postrasplante.

Sobrevivencia celular.

La diferencia en el número total de células inmunorreactivas a TH en el interior del implante entre el grupo transplantado en el ventrículo lateral y los grupos transplantados en el parénquima estriatal fué de alrededor del 80%.

Empleando trasplantes de médula adrenal fetal, Kordower y colaboradores (1990) encontraron menor sobrevivencia de células inmunorreactivas a TH en los trasplantes colocados intraparenquimalmente en el estriado de rata, en comparación con los trasplantes colocados en el ventrículo, diferencia en la sobrevivencia celular de alrededor del 76% entre el grupo transplantado, porcentaje similar al reportado en esta investigación.

Considerando que en este reporte los trasplantes se realizaron con la médula adrenal extraída de fetos con 17-18 días de gestación, edad óptima para la sobrevivencia del trasplante (Simonds y Freed, 1990), se esperaría que el trasplante conservara buena parte del volumen del tejido inicialmente transplantado, hecho que sólo se presentó cuando el tejido se colocó intraventricularmente, de 1 μ l transplantado se conservó 0.82 μ l. Se puede especular que en este experimento las diferencias en el volumen de tejido sobreviviente y el número de células inmunorreactivas a TH localizados entre ambos sitios de trasplante se deba a uno o varios componentes en el medio que favorezcan -en el caso del ventrículo- o limiten -en el parénquima estriatal- el curso natural del desarrollo del trasplante.

Entre los componentes del medio que pueden influir sobre la sobrevivencia de las

células implantadas se encuentra el estrés oxidativo. Existen datos que ponen de relieve la susceptibilidad de las células dopaminérgicas transplantadas al estrés oxidativo, durante o después de ser colocadas (Coyle y Puttfarcken, 1993; Olanow, 1993; Nakao y cols., 1995). Nakao y colaboradores (1995) refieren el incremento en la media de sobrevivencia de las neuronas inmunoteñidas a TH (de 310 a 1250 células, aumento equivalente al 75.2%) y aumento en el volumen del trasplante (de 0.697 mm³ a 0.812 mm³, aumento equivalente al 14.16%) cuando el tejido implantado estriatalmente es extraído de ratones transgénicos con 2 o más copias para el gene expresor de la superoxidasa dismutasa - enzima encargada de la detoxificación de radicales libres-. Es interesante hacer notar que en el experimento de Nakao y colaboradores (op. cit.) la cantidad de células sobrevivientes en los trasplantes de tejido extraído del ratón normal es semejante a la sobrevivencia celular encontrada en los animales de nuestro experimento en los que se depositó el tejido en el parénquima estriatal, mientras que la sobrevivencia de células inmunorreactivas a TH reportada cuando se realizó el trasplante de tejido donado por ratones transgénicos es similar a la sobrevivencia celular encontrada por nosotros en el grupo en el que el trasplante se colocó intraventricularmente, datos que nos hacen pensar que los radicales libres pudieron jugar un papel importante en la sobrevivencia celular de nuestros trasplantes.

Por otro lado, entre los componentes que se sabe tienen influencia sobre la conservación del trasplante se encuentran los factores tróficos. Stromberg y colaboradores (1985) reportan que después de 3 meses de haber transplantado bloques de médula adrenal en el estriado de rata, la sobrevivencia de células inmunoteñidas a TH fue de 127±29 células. Este número se incrementó en un 28.28%, con la infusión de NGF. Se ha propuesto que la viabilidad de los trasplantes de las células cromafines a los ganglios basales está limitada por los bajos niveles de NGF en el estriado (Springer, 1988). En ratas está demostrado que el exceso de NGF en las células cromafines transplantadas en el estriado incrementan la sobrevivencia celular significativamente (Bing y cols., 1988; Stromberg y cols., 1985). En algunos experimentos se ha logrado incrementar la sobrevivencia del tejido transplantado recurriendo al cotrasplante del tejido

dopaminérgico acompañado de factores tróficos o de tejido que se sabe contiene factores tróficos (Cunningham y cols., 1991; 1994; Doering 1992; Date y cols., 1993; Takayama y cols., 1995; Chalmers y cols., 1995).

Debido a el efecto benéfico que han probado ejercer los factores tróficos, se podría pensar que una de las causas de la diferencia en el volumen y sobrevivencia entre las dos zonas donde se colocó el trasplante en nuestro caso, correspondería a las cantidades de factores tróficos en el medio. Jousselein y colaboradores (1993) transplantando la médula adrenal fetal de ratón en el estriado de ratones adultos reportaron que una vez transcurridos 3 meses el volumen del implante se incrementó al aplicar NGF en un 38.8%, y las células contenidas en el trasplante e inmunoteñidas a TH mostraron somas de volumen 36.15% mayor que en el caso de trasplantes similares pero sin infusión de NGF. Cabe señalar que en los datos reportados en este trabajo, aún cuando no se realizó la infusión de factores tróficos, el área ocupada por el soma celular fue 41.86% mayor en el grupo transplantado intraventricularmente comparado con los grupos transplantados intracaudalmente.

En nuestro caso la sobrevivencia del tejido transplantado puede estar limitada por la cantidad de factores tróficos en el parénquima estriatal; y no se puede descartar que estos factores no sean selectivos para algún tipo de células contenidas en la médula adrenal, de ahí la diferencia en el número de células remanentes entre ambas zonas de colocación del trasplante.

Volumen del trasplante y sobrevivencia celular.

En cuanto a la sobrevivencia celular se debe considerar que la mayor muerte de células se presenta en el momento en que se realiza la manipulación del tejido, al extraerlo e implantarlo durante la cirugía, ya que el número de células sobrevivientes no varía con el tiempo después de su implantación (Stromberg y cols., 1985; Nakao y cols., 1995). En nuestro caso se perdió el 18% del total del volumen de tejido en los trasplantes colocados en ventrículo lateral, mientras que para los grupos transplantados en

parénquima estriatal la pérdida de volumen fué del 75 al 91.88%. Esto nos lleva a relacionar la muerte celular con el medio al que se integra el tejido transplantado, ya que en todos los trasplantes se siguió el mismo procedimiento. Es decir que la poca sobrevivencia en el estriado se deba a la escasez de nutrientes en el medio, o a la dificultad de que estos nutrientes lleguen a las células que los necesitan. Otra posibilidad sería que el tejido se perdió al momento de inyectarlo, que se haya quedado dentro de la pipeta parte de él. Sin embargo esta posibilidad es muy remota ya que como se mencionó previamente el tejido se colocaba en el interior de una micropipeta de vidrio, lo que permitía observar el desplazamiento del tejido al interior del cerebro y tener un buen control de los volúmenes de tejido empleados.

Se sabe que los mayores índices de sobrevivencia al transplantar el tejido en piezas sólidas se logran al colocar el tejido en los ventrículos laterales (Rosenstein y Brightman, 1978; Perlow y cols., 1979; Freed y cols., 1980), en nuestro caso el tejido se transplantó en piezas sólidas y nuestros resultados corroboran esta afirmación.

Se ha reportado que los trasplantes de médula adrenal colocados en el ventrículo lateral permanecen relativamente intactos después de 10 semanas del implante con presencia de células de forma redondeada e inmunorreactivas a TH (Takashima y cols., 1992). Coincidiendo con nuestros resultados Nishino y colaboradores (1986a) señalan que el mejor desarrollo de los trasplantes intraventriculares se puede relacionar con el menor daño proporcionado por la zona de implante.

Las mediciones sobre el área de las células inmunorreactivas a TH indican que en el grupo con el trasplante colocado en el ventrículo lateral, el tamaño promedio del soma es 41.86% mayor que cuando el trasplante se coloca en el parénquima del núcleo caudado. Entre los grupos transplantados en parénquima estriatal no hay diferencias significativas en el volumen del trasplante y ni en el tamaño de los somas de las células inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa.

Dentro del tejido transplantado en el parénquima estriatal se encontró menor número de células inmunorreactivas, en comparación con el grupo con el trasplante colocado en el ventrículo lateral. De acuerdo con nuestros resultados, previamente se ha

reportado que los trasplantes de médula adrenal colocados en el interior del núcleo caudado, aún cuando producen disminución en la conducta de giro, no tienen una apariencia tan robusta como los colocados en ventrículo lateral, presentando pocas células inmunoteñidas a TH acompañadas por tejido necrótico (Nishino y cols., 1986a; Becker y cols., 1990a).

Cabe destacar que entre los dos grupos de ratas que fueron transplantados en el parénquima estriatal no hubo diferencias significativas en cuanto al volumen del tejido postransplante a pesar de que el volumen inicialmente transplantado fue muy diferente. Igualmente, no se encontraron diferencias significativas entre el número de células inmunorreactivas a TH y el tamaño del soma de estas células entre ambos grupos. No existen otros reportes al respecto y por lo mismo, tampoco se han sugerido posibles explicaciones. Habría que considerar la existencia de alguna forma de control o daño dentro del estriado que limite el crecimiento y desarrollo de los trasplantes colocados en el caudado, algunas de estas posibilidades son las que se han señalado previamente.

El predominio de la forma ovalada en las células inmunorreactivas en los trasplantes colocados en el parénquima estriatal o en el ventrículo lateral puede estar relacionado con la inclusión de corteza adrenal cuando se realizó el trasplante de médula adrenal, lo que mantendría el fenotipo de las células cromafines, dada la presencia de corticoesteroides (Olson, 1970; Wurtman y cols., 1972; Unsicker y cols., 1978; 1980; Olson y cols., 1980; Tischler y Grenee, 1980; Freed y cols., 1984). Se considera esta posibilidad debido a que el trasplante se realizó inmediatamente después de extraer la médula adrenal del donador, y se trataba de retirar la corteza rápidamente. O bien por la presencia de corticoesteroides en las zonas del cerebro receptor en donde se colocó el trasplante.

CONCLUSION:

Los trasplantes de médula adrenal fetal colocados en el ventrículo lateral tienen volumen de sobrevivencia, células inmunoteñidas a TH y soma celular de tamaño significativamente mayor que los trasplantes de médula adrenal fetal colocados en el parénquima estriatal de animales denervados unilateralmente con 6-OHDA, sin embargo, la conducta de giro no presenta cambios en ambos tipos de trasplantes.

La conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos no presenta cambios significativos cuando se transplanta médula adrenal fetal en el ventrículo lateral $-1 \mu\text{l}$ - o en el parénquima estriatal -1 o $5 \mu\text{l}$ - de animales denervados unilateralmente con 6-OHDA.

Los trasplantes de médula adrenal fetal colocados en el parénquima estriatal tienen volumen de sobrevivencia, células inmunoteñidas a TH y soma celular de tamaño similar a pesar de los diferentes volúmenes inicialmente injertados -1 y $5 \mu\text{l}$ -.

Bibliografía:

- Aebischer, P., Treco, P.A., Sagen, J. y Winn, S.R. (1991) Transplantation of microencapsulated bovine chromaffin cells reduces lesion-induced rotational asymmetry in rats. *Brain Res.*, 560, 1-2, 43-49.
- Backlund, E.O., Granberg, P.O., Hamberger, B., Knutsoon, E., Matensson, A., Seigel, G. y Olson, L. (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J. Neurosurg.* 62, 169-173.
- Bakay, R.A.E., Watts, R.L., Freeman, A., Iuvone, P.M., Watts, N. y Graham, S.D. (1990) Preliminary report on adrenal-brain transplantation for parkinsonism in man. *Stereotactic. Funct. Neurosurg.*, 54, 55, 312-323.
- Bankiewicz, K. S., Oldfield, E.H. Chiueh, C.C., Doppman, J.L. Jacobowitz, D.M. y Kopin, I.J. (1986) Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci.*, 39, 7-16.
- Becker, J. B. y Freed W. J. (1988)a. Adrenal medulla grafts enhance functional activity of the striatal dopamine system following nigra lesion. *Brain Res.* 462, 401-406.
- Becker, J. B. y Freed W. J. (1988)b. Neurochemical correlates of behavioral changes following intraventricular adrenal medulla grafts: Intraventricular microdialysis in freely moving rats. *Prog. Brain Res.* 78, 527-533.
- Becker, J. B., Curran, E.J. y Freed W. J. (1990)a. Adrenal medulla induced recovery of function in an animal model of Parkinson's Disease: Possible mechanisms of action. *Canadian Journal of Psychology*, 44(2), 293-310.
- Becker, J. B., Curran, E.J., Freed, W. J. y Poltorak, M. (1990)b. Mechanisms of action of adrenal medulla grafts: the possible role of peripheral and central dopamine systems. *Dunnett y Richards (Eds.) Progress in Brain Res.* V-82, Cap.-57, 499-507.
- Berg, D.K. (1982) Neural development. Spitzer, N.C. (ed.) Plenum Press. N.Y., 297-331.
- Bing, G., Notter, M.F.D., Hansen, J.D. (1988) Comparison of adrenal medullary, carotid body and PC12 cell grafts in 6-OHDA lesioned rats. *Brain Res. Bull.* 20, 399-406.
- Björklund, A. y Stenevi, U. (1979). Reconstruction of the nigro-striatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 177, 555-560.
- Björklund, A., Schmidt, R.H. y Stenevi, U. (1980). Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by the use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res.* 212, 39-45.
- Björklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R.H. y Dunnett, S.B. (1983). Intracerebral grafting of neural cell suspensions. II Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol. Scandinavica.*, Sup. 522, 9-19.

- Bohn, M.C., Cupit, L., Marciano, F. y Gash, D. (1987) Adrenal medulla grafts enhance recovery of striatal dopaminergic fibers. *Science*. 237. 913-916.
- Borges, L.F. (1988). Historical development of neural transplantation. *Appl. Neurophysiol.* 51, 265-277.
- Broadwell, R.D., Charlton, H.M., Ebert, P., Hickey, W.F., Shirazi, Y., Villegas, J. y Wolf, A. L. (1991) Allografts of CNS tissue possess a blood-brain barrier. II. Angiogenesis in solid tissue and cell suspension grafts. *Experimental Neurol.* 112, 1-18.
- Brundin, P., Isacson, O. y Björklund, A. (1985). Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival. *Brain Res.* 331, 251-259.
- Brundin, P., Strecker, R.E., Lindvall, O., Isacson, O., Nilsson, O.G., Barbin, G., Prochiantz, A., Forni, C., Nieoullon, A., Winder, H., Gage, F.H. y Björklund, A. (1986). Intracerebral grafting of dopamine neurons. Experimental basis for clinical trials in patients with Parkinson's disease. En: Azmitia, E. y Björklund, A. (Eds.) *Cell and tissue transplantation into the adult brain.* Ann. New York Acad. Sci. 495, 473-496.
- Brundin, P., Strecker, R.E., Winder, H., Clarke, D.J., Nilsson, O.G., Astedt, B., Lindvall, O., y Björklund, A. (1988). Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: Immunological aspects, spontaneous and drug-induced behavior, and dopamine release. *Exp. Brain Res.*, 70, 192-208.
- Carman, L.S., Gage, F.H. y Schultz, W. (1991) Partial lesion of the substantia nigra: Relation between extent of lesion and rotation behavior. *Brain Res.*, 553, 275-283.
- Carswell, S. (1993) The potential for treating neurodegenerative disorders with NGF-inducing compounds. *Experimental Neurology.* 124, 36-42.
- Carvey, P.M., Ptak, L.R., Nath, S.T., Sierens, D.K., Mufson, E.J., Gwotz, C.G. y Klawans, H.L. (1993) Striatal extracts from patients with Parkinson's disease promote dopamine neurons growth in mesencephalic cultures. *Exp. Neurol.* 120, 149-152.
- Chalmers, G.R., Fisher, L.J., Nijima, K., Patterson, P.H. y Gage, F.H. (1995) Adrenal chromaffin cells transdifferentiate in response to basic fibroblast growth factor and show directed outgrowth to a nerve growth factor source in vivo. *Exp. Neurol.*, 133, 1, 32-42.
- Chang, G.D. y Ramirez, V.D. (1988). A potent dopamine-releasing factor is present in high concentrations in the rat adrenal gland. *Brain Research.* 463, 385-389.
- Chkirate, M., Vallée, A. y Doucet, G. (1993). Host striatal projections into fetal ventral mesencephalic tissue grafted to the striatum of immature or adult rat. *Exp. Brain Res.* 94, 357-362.
- Choi, C.R., Lee, J.S., Sung, K.W. y Song, J.U. (1990) Adrenal medullary transplantation for Parkinson's disease. *Stereotactic. Funct. Neurosurg.*, 54, 55, 324-327.
- Choi, W.S., Kim, M.O. y Ramirez, V. D. (1993) Immunocytochemical localization of

dopamine-releasing protein in the rat adrenal. *Neuroendocrinology.*, 58, 4, 440-447.

- Christie, J.E. y Crown, T.J. (1971). Turning behavior as an index of the action of amphetamines and ephedrines on central dopamine-containing neurons. *British Journal of Pharmacology*, 43, 658-667.
- Chung, S.S., Park, Y.G., Chang, J.W. y Cho, J. (1994) Long-term follow-up results of stereotactic adrenal medullary transplantation in Parkinson's disease. *Stereotactic. Funct. Neurosurg.* 62, 1, 4, 141-147.
- Clarke, D.J., Brundin, P., Strecker, R.E., Nilsson, O.G., Björklund, A. y Lindvall, O. (1988). Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: ultrastructural evidence for synapse formation using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Exp. Brain. Res.* 73, 1, 115-126.
- Cochard, P., Goldstein, M., y Black, I. (1979). Initial development of the noradrenergic phenotype in autonomic neuroblasts of the rat embryo in vivo. *Devl Biol.* 71, 100-114.
- Collier, T.J., Gallagher, M.J. y Sladek, C.D. (1993) Cryoconservation and storage of embryonic rat mesencephalic dopamine neurons for one year: Comparison to fresh tissue in culture and neural grafts. *Brain Res.*, 623, 2, 249-256.
- Collier, T.J., Elsworth, J.D., Taylor, J.R., Sladek, J.R., Roth, R.T. y Redmond, D.E. (1994) Peripheral nerve-dopamine neuron cogafts in MPTP-treated monkeys: Augmentation of tyrosine hydroxylase-positive fiber staining and dopamine content in host system. *Neurosci.*, 61, 4, 875-889.
- Coupland, R.E. y Tomlinson, A. (1989). The development and maturation of adrenal medullary chromaffin cells of the rat in vivo: a descriptive and quantitative study. *Int. J. Devl. Neuroscience.* V-7,N-5, 419-438.
- Coyle, J.T. y Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262, 689-694.
- Cunningham, L.A., Hansen, J.T., Short, M.P. y Bohn, M.C. (1991) The use of genetically altered astrocytes to provide nerve growth factor to adrenal chromaffin cells grafted into the striatum. *Brain. Res.*, 561, 2, 192-202.
- Cunningham, L.A., Short, M.P., Breakefield, X. O. y Bohn, M.C. (1994) Nerve growth factor release by transgenic astrocytes enhances the function of adrenal chromaffin cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, 658, 1-2, 219-231.
- Curran, E.J., Albin, R.L., Becker, J.B. (1993) Adrenal medulla grafts in the hemiparkinsonian rat: Profile of behavioral recovery predicts restoration of the symmetry between the two striatal in measures of pre- and postsynaptic dopamine function. *J. Neurosci.*, 13, 9, 3864-3877.
- Das, G.D., Hallas, B.H. y Das, K.G. (1979) Transplantation of neural tissue in the brains of laboratory mammals: Technical details and comments. *Experientia.* 35, 143.

- Date, I., Felten, S.Y., Olschowka, J.A. y Felten D.L. (1990) Limited recovery of striatal dopaminergic fibers by adrenal medullary grafts in MPTP-treated aging mice. *Experimental neurology*. 107, 197-207.
- Date, I., Yoshimoto, Y., Gohda, Y., Furuta, T., Asari, S., Ohmoto, T., Bakay, R.A.E., Penn, R. D. y Kordower, J. (1993) Long-term effects of cografts of pretransected peripheral nerve with adrenal medulla in animal models of Parkinson's disease. *Neurosurgery*, 33,4, 685-690.
- Date, I., Asari, S., Ohmoto, T. y Bakay, R.A.E. (1995) Two-year follow-up study of patient with Parkinson's disease and severe motor fluctuations treated by co-grafts of adrenal medulla and peripheral nerve into bilateral caudate nuclei: Case report. *Neurosurgery*. 37, 3, 515-519.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.N., Caine, E.D., Reichert, C.M. y Kopin, I.J. (1979) Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogs. *Psychiatry Res.*, 1, 249-254.
- DeBaurepaire, R. y Freed, W.J. (1987) Embryonic substantia nigra grafts innervate embryonic striatal co-grafts in preference to mature host striatum. *Exp. Neurol.* 95, 448-454.
- Del Conte, G. (1907) Einpflanzungen von embryonalem gewede ins gehirn. *Beitr. path. Anat. allg. Pathol.*, 42, 193-203.
- DeLong, M.R. (1974) Motor functions of the basal ganglia: Single unit activity during movement. En: *Neurosciences*, 3th study program. Schmitt, F.O. y Worden, F.G. (Eds.) Cambridge, MIT Press, 319-324.
- Diamont, S.G., Markham, C.H., Rand, R.W., Becker, D.P. y Treciokas, L.J. (1994) Four-year follow-up adrenal-to-brain transplants in parkinson's disease. *Arch. Neurol.*, 51, 6, 559-563.
- Di Porzio, U., Daguet, M.C., Glowinski, J. y Prochiantz, A. (1980) Effect of estriatal cells on in vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons grown in serum-free conditions. *Nature*, 188,370-373.
- Doering, L.C. (1992) Peripheral nerve segments promote consistent long-term survival of adrenal medulla transplants in the brain. *Exp. Neurol.*, 118, 3, 253-260.
- Donnan, G.A., Kaczmarczyc, S.J., McKenzie, J.S., Rowe, R., Kalnins, R.M. y Mendelsohn, F.A. (1987) Regional and temporal effects of 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP) on dopamine uptake sites in mouse brain. *J. Neurol. Sci.*, 81, 261-271.
- Dravid, A., Jatón, A.L., Enz, A. y Frei, P. (1984) Spontaneous recovery from motor asymmetry in adult rats with 6-hydroxydopamine-induced partial lesions of the substantia nigra. *Brain Res.* 311, 361-365.
- Drucker-Colín, R. Madrazo, I., Ostrosky-Solis, F., Shkurovich, M. y Torres, C. (1988) Adrenal medullary Tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinsons patients. *Prog. Brain Res.* 78, 567-574.
- Dubach, M. y German, D.C. (1990) Extensive survival of chromaffin cells in adrenal medulla

"ribbon" grafts in the monkey neostriatum. *Experimental Neurology*. 110. 167-180.

- Dunnett, S.B., Björklund, A., Stenevi, U. e Iversen, S.D. (1980) Behavioral recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I Unilateral lesions. *Brain Res.* 241, 146-161.

- Dunnett, S.B. (1992) Transplantation of dopamine neurons. *Sem. in Neurosc.* 4, 161-164.

- Edgar, D. y Barde Y. A. (1983) Neural growth factors. *TINS*. Julio, 260-262.

- Emerich, D.F., Winn, S.R., Christenson, L., Palmatier, M.A., Gentile, F.T. y Sanberg, P.R. (1992) A novel approach to neural transplantation in parkinson's disease: Use of polymer-encapsulated cell therapy. *Neurosc. Biochem. Rev.* 16, 4, 437-447.

- Fink, J.S. y Smith, G.P. (1980) Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res.* 199, 354.

- Fisher, L.J., Young, S.J., Tepper, J.M., Groves, P.M. y Gage, F.H. (1991) Electrophysiological characteristics of cell whitening mesencephalon suspensión grafts. *Neuroscience*. 40, 109-122.

- Fisher, L.J. y Gage, F.H. (1993). Grafting in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*. V-67, N-3, 583-616.

- Forni, C., Brundin, P., Strecker, R.E., Ganouni, E., Björklund, A. y Nieoullon, A. (1989) Time-course of recovery of dopamine neuron activity during reinnervation of the denervated striatum by fetal mesencephalic grafts as assessed by in vivo voltammetry. *Exp. Brain Res.* 76, 75-87.

- Fox, C.A., Andrade, A.N., Schwyn, R.C. y Rafols, J.A. (1971) The spiny neurons in the primate striatum: A golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.*, 13, 181-201.

- Freed, W.J., Perlow, M.J., Karoum, F., Seiger, A., Olson, L., Hoffer, B.J. y Wyatt, R.J. (1980). Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal substantia nigra to the caudate nucleus: long-term behavioral, biochemical, and histochemical studies. *Ann. Neurol.*, 8, 510-519.

- Freed, W.J., Morihisa, J.M., Spoor, E., Hoffer, B., Olson, L., Seiger, A. y Wyatt, R.J. (1981). Transplanted adrenal chromaffin cells in brain reduce lesion-induced rotational behavior. *Nature (London)* 292, 351-352.

- Freed, W.J. (1983). Functional brain tissue transplantation: Reversal of lesion-induced rotation by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retina grafts. *Biol. Psychiatry*. 18, 1205-1267.

- Freed, W.J., Karoum, F., Spoor, H. E., Olson, L., Morihisa, J.M y Wyatt, R.J. (1983). Catecholamine content of intracerebral adrenal medulla grafts. *Brain Res.* 269, 184-189.

- Freed, W.J., Hoffer, B.J. Olson, L. y Wyatt, R.J. (1984) Transplantation of catecholamine-containing tissues to restore the functional capacity of the damaged nigrostriatal system. *En:*

- Sladek, J. y Gash, D. Neuronal transplants, development, and function. Plenum Press. New York. Cap. 16, 373-406.
- Freed, W.J., Cannon-Spoor, H.E. y Krauthamer, E. (1986). Intrastratial adrenal medulla grafts in rats. Long-term survival and behavioral effects. *J. Neurosurg.*, 65, 664-670.
 - Freed, W.J. (1988). Adrenal medulla grafts in animals. *Science*. 241, 247.
 - Freund, T., Bolan, J.P., Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B. Powell, J.F. y Smith, A.D. (1985) Efferent synapsis connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J. Neurosci.* 5, 603-616.
 - Frodl, E.M., Duan, W.M., Sauer, H., Kupsch, A. y Brundin, P. (1994) Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: Effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function. *Brain Res.*, 647, 286-298.
 - Gage, F.H., Dunnett, S.B., Stenevi, U. y Björklund, A. (1983) Aged rats: recovery of motor impairments by intrastratial grafts. *Science*. 221, 966-969.
 - Geist, M.J., Maris, D.O. y Grady, M.S. (1991) Blood-brain barrier permeability is not altered by allograft or xenograft fetal neural cell suspension grafts. *Exp. Neurol.* 111, 2, 166-174.
 - Hallman, H., Lange, J., Olson, L., Stromberg, I. (1985) Neurochemical and histological characterization of 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *J. Neurochem.*, 44, 117-127.
 - Hamburger, V. and Oppenheim, R. W. (1982) Naturally-occurring neuronal death in vertebrates. *Neurosc. Comment.* 1, 38-55.
 - Hansen, J.T., Kordower, J.H., Fiandaca, M.S., Jiao, S.S., Notter, M.F.D. y Gash, D.M. (1988) Adrenal medullary autografts into basal ganglia of cebus monkeys: graft viability and fine structure. *Exp. Neurology.* 102, 65-75.
 - Haque, N.S.K., Hlavin, M.L., Du, J.S., Fawcett, J.W. y Dunnett, S.B. (1995) In vivo effects of kGF on embryonic nigral grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport.*, 6, 16, 2177-2181.
 - Harman, D. (1985) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Univ. Calif. Rad. Lab. Report No 3078.* Citado en: Harman, D. (1987) The free-radical theory of aging. En: Warner, H.R. (Ed.) *Modern theories of aging.* Raven Press, N.Y. 81-87.
 - Hefti, F., Melamed, E. y Wurtman, R.J. (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: Biochemical characterization. *Brain Res.* 195, 123-137.
 - Heikkila, R.E. y Cohen, G. (1971) Inhibition of amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for the toxic effects of 6-hydroxidopamine. *Science*, 172, 1257-1258.
 - Heikkila, R.E., Hess, A. y Duvoisin, C. (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Science*, 224, 1451-1453.

- Heikkila, R.E., Hess, A. y Agid, A. (1985) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: Relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci.*, 36, 231-236.
- Heim, R.C., Willingham, G. y Freed, W.J. (1993). A comparison of solid intraventricular and dissociated intraparenchymal fetal nigral grafts in a rat model of Parkinson's disease: impaired graft survival is associated with high baseline rotational behavior. *Experimental Neurology*. 122, 5-15.
- Hemmendinger, L.M., Gerber, B.B., Hoffman, P.C. y Heller, A. (1981) Target neuron-specific process formation by embryonic mesencephalic dopamine neurons *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 1264-1268.
- Herrera-Marschitz, M., Stromberg, I., Olsson, D., Olson, L. y Ungertedt, U. (1984) Adrenal medullary implants in the dopamine-denervated rat striatum. II. Rotational behavior during the first seven hours as a function of graft amount and location and its modulation by neuroleptics. *Brain Research*. 297, 53-61.
- Hoffer, B.J., Leenders, K.L., Young, D., Gerhardt, G., Zerbe, G.O., Bydeman, M., Seiger, A., Olson, L., Stromberg, I. y Freedman, R. (1992) Eighteen-month course of two patients with grafts of fetal dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 118, 3, 243-252.
- Horellou, P., Marlier, L., Privat, A. y Mallet, J. (1990) Behavioural effect of engineered cells that synthesize L-DOPA or dopamine after grafting into the rat neostriatum. *European J. of Neuroscience*. 2, 116-119.
- Horellou, P., Lundberg, C., Le-Bourdelle, B., Victorin, K., Kalen, P., Björklund, A. y Mallet, J. (1991) Behavioural effects of genetically engineered cells releasing DOPA and dopamine after intracerebral grafting in a rat model of Parkinson's disease. *J. Physiol.* 83, 3, 158-170.
- Hori, Y., Kageyama, H., Kihara, T., Ikeda, M., Nakano, A. y Kurosawa, A. (1993) Transient improvement of amphetamine-induced rotational behavior by PC12 cell grafts: Studies with microanalysis. *Restor. Neurol. Neurosc.*, 6, 1, 49-55.
- Hudson, J.L., Bickford, P., Johansson, M., Hoffer, B.J. y Stromberg, I. (1994) Target and neurotransmitter specificity of fetal central nervous system transplants - Importance for functional reinnervation. *J. of Neuroscience*. 14,1, 238-290.
- Isacson, O., Brundin, P., Gage F.H. y Björklund, A. (1985) Neural grafting in a rat model of Huntington's disease: progressive neurochemical changes after neostriatal ibotenate lesions and striatal tissue grafting. *Neuroscience*. 16, 799-817.
- Jackson, C. M. (1919). The postnatal development of the supra-renal gland and the effect of inanition upon its growth and structure in the albino rat. *Am. J. Anat.* 25, 221-290.
- Jaeger, C.B. (1986) Axon terminal cluster in nigro-striatal double grafts. *Dev. Brain Res.* 24, 309-314.
- Jankovic, J., Grossman, R., Goodman, C., Pirozzolo, F., Schneider, L., Zhu, Z., Scardino,

- P., Garber, A.J., Jhingran, S.G. y Martin, S. (1989). Clinical, biochemical, and neuropathologic findings following transplantation of adrenal medulla to the caudate nucleus for treatment of Parkinson's disease. *Neurology*, 39, 1227-1234.
- Jiao, S., Gurevich, V. y Wolff, J.A. (1993) Long-term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy. *Nature*, 362, 6419, 450-453.
 - Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S. y Markey, S.P. (1985) Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.*, 36, 219-224.
 - Jousselein-Hosaja, M. (1993) A descriptive and quantitative morphometric study of long-term mouse adrenal medulla implanted into the putamen: effect of nerve growth factor injected at grafting. *Brain Res.*, 627, 275-286.
 - Kelly, P.H.; Seviour, P.W. e Iversen, S.D. (1975) Amphetamine and apomorphine response in the rat following 6-OHDA lesion of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* 94,507.
 - Kirshner, N. (1975) Biosynthesis of catecholamines, in the adrenal gland. *Handbook of endocrinology*. (Eds. : H. Blazchko, G. Sayer and A.D. Smith) 6, 341-355.
 - Kordower, J.H., Massimo, S., Fiandaca, S., Notter, M.F.D., Hansen, J.T., y Gash, D.M. (1990) NGF-like trophic support from peripheral nerve for grafted rhesus adrenal chromaffin cells. *J. Neurosurg.* 73, 418-428.
 - Kordower, J.H., Cochran, E., Penn, R. y Goetz C.H. (1991) Putative chromaffin cell survival and enhanced host-derived TH-fiber innervation following a functional adrenal medulla autograft for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 29, 405-412.
 - Kordower, J.H., Liu, Y.T., Winn, S. y Emerich, D.F. (1995) Encapsulated PC12 cell transplants into hemiparkinsonian monkeys: A behavioral, neuroanatomical and neurochemical analysis. *Cell Transplant.*, 4,2, 155-171.
 - Langston, J.W., Forno, L. S., Roberts, C.S. e Irwin, I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292, 390-394.
 - Langston, J.W., Irwin, I. y Ricaute, G.A. (1987) Neurotoxins, parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharm. Ther.* 32: 19-49.
 - Lauder, J.M. y Bloom, F.E. (1974). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. *J. Comp. Neurol.*,155, 145-160.
 - Leigh, K., Elisevich, K. y Rogers, K.A. (1994) Vascularization and microvascular permeability in solid versus cell suspension embryonic neural grafts. *J. Neurosurg.* 81, 2, 272-283.
 - Lieberman, A.N., Ransohoff, J., Berczeller, P., Brous, P., Eng, K., Goldstein, M., Kaufman, B., Koslow, M. y Chin, L. (1989) Adrenal medullary transplants as a treatment for advanced

Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 126; 189-196.

- Lindsay, R.M., Altar, C.A., Cedarbaum, J.M., Hyman, C. y Wiegand, S.J. (1993) The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 124, 103-118.
- Lindvall, O., Winder, H., Rehnström, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Björklund, A. y Marsden, C.D. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: One-year clinical and neurophysiological observation in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol.* 31, 2, 155-165.
- Lindvall, O., Sawle, G., Winder, H., Rothwell, J.C., Björklund, A., Brooks, D., Brundin, P., Frackowiak, R., Marsden, C.D. y Odin, P. (1994) Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 35, 2, 172-180.
- López-Lozano, J., Bravo, G. y Abascal, J. (1991) Grafting of perfused adrenal medullary tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *J. Neurosurg.*, 75, 234-243.
- Lu, S.Y., Giordano, M., Norman, A.B., Shipley, M.T. y Samberg, P.R. (1990) Behavioral effects into the intact striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 37, 135-148.
- Luchmund, A., Gehrke, D., Krieglstein, K. y Unsicker, K. (1994) Trophic factors from chromaffin granules promote survival of peripheral and central nervous system neurons. *Neuroscience.* 62, 2, 361-370.
- Machado-Salas, J.P., Cornejo, A., Ibarra, O., Martínez, D.F., Huerta, G. y Kuri, J. (1990) Multidisciplinary analysis of the effectiveness of autologous neural transplant (Adrenal medulla) as treatment of Parkinson's disease. *Stereotact. Func. Neurosurg.* 54, 55, 306-311.
- Madrazo, I., Drucker-Colín, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C. y Becerril, J.J. (1987) Open microsurgical autografts of autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in Two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Eng. J. Med.* 316, 831-834.
- Mahalik, T.J., Finger, T.E., Stromberg, I. y Olson, L. (1985) Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: Ultrastructure of graft and host interconnections. *J. of Comp. Neurol.* 240, 60-70.
- May, R.M. (1930) La greffe dans l'œil de rat blanc adulte du tissu cérébral de rat nouveau-né. *Archs. Anat. Microsc. Morph. exp.* 26, 433-439.
- May, R.M. (1945) Régénération cérébrale provoquée par la greffe intraoculaire simultanée de tissu cérébral de nouveau-né et de nerf sciatique chez la souris. *Bull., Biol., Fr., Belg.*, 79, 151-154.
- Mendez, I., Elisevich, K. y Flumerfelt, B. (1991) Dopaminergic innervation of substance P-containing striatal neurons by fetal nigral grafts: an ultrastructural double-labeling immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 308, 66-78.

- Mendoza-Ramírez, J.L., Aguilar-Robledo, R., Zainos-Rosales, A. and Drucker-Colin, R. (1991) Fetal substantia nigra and adrenal medullary grafts placed contralateral to the nigrostriatal lesion side induce a decrease in turning behavior but not in dopamine density. *Rest. Neurol. and Neuroscience*.
- Miller, R. y Beninger, R.J. (1991) On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonists in animal with unilateral depletion of striatal dopamine. *Progress in Neurobiology*. 36, 229-256.
- Morihisa, J.M., Nakamura, R.K., Freed, W.J., Mishkin, M. y Wyatt, R.J. (1984). Adrenal medulla graft survive and exhibit catecholamine-especific fluorescence in the primate brain. *Exp. Neurol.* 84, 643-653.
- Murphy, J.E. y Sturm, E. (1923) Conditions determining the transplantability of tissue in the brain. *J. Exp. Med.* 38, 183.
- Nakao, N., Frodl, E.M., Winder, H., Carlson, E., Eggerding, F.A., Epstein, C.J., y Brundin, P. (1995) Overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase enhances survival of transplanted neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Nature med.*, 1, 3, 226-231.
- Nikkha, G., Cunningham, M.G., Jodicke, A., Knappe, U. y Björklund, A. (1994) Improvement graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspension in the rat Parkinson model. *Brain Res.*, 633, 1-2, 133-143.
- Nishi, K., Kondo, T. y Narabayashi, H. (1989) Difference in recovery patterns of striatal dopamine contents, tyrosine hydroxylase activity and total bipterin contents after 1-methyl-4,phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP) administration: A comparison of young and older mice. *Brain Res.*, 489, 157-162.
- Nishino, H., Ono, T., Takahashi, J., Kimura, M., Shiosaka, S. y Tohyama, M. (1986)a. Transplants in the peri- and intraventricular region grown better than those in the central parenchyma of the caudate. *Neuroscience Letters*. 64, 184-190.
- Nishino, H., Ono, T., Takahashi, J., Kimura, M., Shiosaka, S., Yamasaki, H., Hatanaka, H. y Tohyama, M. (1986)b The formation of new neuronal circuit between transplanted nigral dopamine neurons and non-immunoreactive axon terminals in the host rat caudate nucleus. *Neuroscience Letters*. 64, 13-16.
- Nishino, H., Taketoshi, O., Shibata, R., Kawamata, S., Watanabe, H., Shiosaka, S., Tohyama, M. y Karadi, Z. (1988). Adrenal medullary cells transmute into dopaminergic neurons in dopamine-depleted rat caudate and ameliorate motor disturbances. *Brain Research*, 445, 325-337.
- Nishino, H., Hashitani, T., Kumasaki, M., Sato, H., Furuyama, F., Isobe, Y., Watari, N., Kanai, M., y Shiosaka, S. (1990). Long-term survival of grafted cells, dopamine synthesis/release, synaptic connections, and functional recovery after transplantation of fetal nigral cells in rats with unilateral 6-OHDA lesions in the nigrostriatal dopamine pathway. *Brain Res.*, 534, 83-93.
- Olanow, C.W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.*, 16, 11, 439-444.

- Olson, L. (1970) Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medulla tissue. *Histochemic.* 22, 1-7.
- Olson, L., Seiger, A., Freedman, R. y Hoffer, B. (1980) Chomaffine cells can enervate brain tissue: Evidence from intraocular double grafts. *Exp. Neurol.* 70, 414.
- Olson, L., Stromberg, I., Herrera-Marschitz, M., Ungersted, U. y Ebendal, T. (1985) Adrenal medullary tissue grafted to the dopamine-denervated striatum: Histochemical and functional effects of addition of nerve growth factor. En: Björklund, A. y Stenevi, U (Eds.) *Nigral grafting in the mammalian CNS.* Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, 505-525.
- Østergaard, K. y Rasmussen, J.Z. (1991) Experimental clinical transplantation in patients whit Parkinson's disease. *Experimental background and clinical picture.* *Ugeskr Laeger,* 153, 50, 3554-3558.
- Patel-Vaidya, U., Wells, M.R. y Freed, W.J. (1985). Survival of dissociated adrenal cromaffin cells of rat and monkey transplanted into rat brain. *Cell Tiss. Res.* 240, 281-285.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1986). *The rat brain in Stereotaxic Coordinates.* 2nd edn. Academic Press, New York.
- Perlow, M.J., Freed, W.J., Hoffer, B.J., Seiger, A., Olson, L. y Wyatt, R.J. (1979) Brain grafs reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science.* 204, 643-646.
- Pezzoli, G., Fahn, S., Dwork, A., Truong, D.D., Yebenes, J.G., Jackson-Lewis, V., Herbert, J. y Cadet, J.L. (1988) Non-chomaffin tissue plus nerve growth factor reduces experimental parkinsonism in aged rats. *Brain Research.* 459, 398-403.
- Poltorak, M. y Freed, W. J. (1990) Cell Adhesion mplecules in adrenal medulla grafts: Enhancement of cromaffin cell L1/Ng-CAM expression and reorganization of extracellular matrix following transplantation. *Experimental Neurology.* 110, 73-85.
- Prochiantz, A., DiPorzio, U., Kato, A., Berger, B. y Glowinski, J. (1979) In vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons from mause embryos is enhanced in presence of their striatal target cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 76, 5387-5391.
- Puchacz, E., Stachowiak, E.K., Florkiewicz, R.Z., Lukas, R.J. y Stachowiak, M.K. (1993) Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulates tyrosine hydroxylase and proenkephalin mRNA levels in adrenal chomaffin cells. *Brain Research.* 610, 39-52.
- Redmond, D.E., Naftolin, F., Collier, T.J., Leranth, C., Robbins, R.J., Sladek, C.D., Roth, R.H. y Sladek, J.R. (1988) Cryopreservation, culture, and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into mokeys. *Science.* 242, 768-771.
- Roberts, R.C. y DiFiglia, M. (1988) Localization of immunoreactive GABA and enkephalin and NADPH-diaphorose-positive neurons in fetal striatal grafs in the quinolinic-acid-lesioned rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 274, 406-421.
- Rosenstein, J.M. y Brightman, M.W. (1978) Intact cerebral ventricle as a site for tissue

transplantation. *Nature (London)*. 275, 83-85.

- Rosenstein, J.M. (1987) Adrenal medulla grafts produce blood-brain barrier dysfunction. *Brain Research*. 414, 192-196.
- Saltykow, S. (1905) Versuche über Gehirnreplantation, Zugleich ein Beitrag zur Kenntniss reaktiver Vorgänge an den zelligen Gehirnalament. *Arch. Psychiat. Nervenkrankh*, 40, 329-388.
- Sauer, H., Frodl, E.M., Kupsch, A., Bruggencate, G. y Oertel, W.H. (1992) Cryoconservation, survival and function of intrastriatal fetal mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Brain Res.* 90, 54-62.
- Sawle, G.V., Bloomfield, P.M., Björklund, A., Brooks, D.J., Brundin, P., Leenders, K.L., Lindvall, O., Marsden, C.D., Rehnström, S., Winder, H. y Frackowiak, R.S.J. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET (18)F 6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol.*, 31, 2, 166-173.
- Schmidt, R., Ingvar, M., Lindvall, O., Stenevi, U. y Björklund, A. (1982) Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating striatum: neurotransmitter metabolism and [14C] 2-deoxy-D-glucose autoradiography. *J. Neurochem.* 38, 737-748.
- Schneider, J. S., Rothblat, D.S. y DiStefano, L. (1994) Volume transmission of dopamine over large distance may contribute to recovery from experimental parkinsonism. *Brain. Res.*, 81, 2, 272-283.
- Segen, J. y Pappas, G.D. (1988) Pharmacologic consequences of the vascular permeability of chomaffin cell transplants in CNS pain modulatory regions. *Exp. Neurol.* 102, 290-297.
- Simonds, G.R. y Freed, W. (1990) Effects of intraventricular substantia nigra allografts as a function of donor age. *Brain Research*. 530, 12-19.
- Sladek, J.R., Collier, T.J., Elsworth, J.D., Taylor, J.R., Roth, R.H. y Redmond, D.E. (1993)a. Can graft-derived neurotrophic activity be used to direct axonal outgrowth of grafted dopamine neurons for circuit reconstruction in primates?. *Exp. Neurology*. 124, 134-139.
- Sladek, J.R., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Evans, L.E., Collier, T.J., Cooper, S.J., Taylor, J.R., y Redmond, D.E. (1993)b. Fetal dopamine cell survival after transplantation is dramatically improved at a critical donor gestational age in nonhuman primates. *Exp. Neurol.*, 122, 1, 16-27.
- Sorensen, J.C., Ostergaard, K. y Zimmer, J. (1994) Grafting of dopaminergic ventral mesencephalic slice cultures to the striatum of adult rats. *Exp. Neurol.*, 127, 199-206.
- Spenser, D.D., Robbins, R.J., Naftolin, F., Marek, K.L., Vollmer, T., Lerner, C., Roth, R.H., Price, L.H., Gjedde, A., Bunney, B.S., Sass, K.J., Elsworth, J.D., Kier, E.L., Makuch, R., Hoffer, P.B. y Redmond, D.E. (1992) Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Brain*. 115, 22, 1541-1548.
- Springer, J.E. (1988) Nerve growth factor receptor produce blood brain barrier dysfunction.

Brain Res. 414, 192-196.

- Stenevi, U.; Björklund, A. y Svendgaard, N.A. (1976) Transplants of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Research*. 114, 1-20.
- Stromberg, I., Herrera-Marschitz, M., Hultgren, L., Ungersted, U. y Olson, L. (1984). Adrenal medulla in the dopamine-denervated rat striatum. I Acute catecholamine-levels in grafts and host caudate as determined by HPLC-electrochemistry and fluorescence histochemical image analysis. *Brain Research*. 297, 41-51.
- Stromberg, I., Herrera-Marschitz, M., Ungersted, U., Hultgren, L. y Olson, L. (1985). Chronic implants of chomaffin tissue into the dopamine denervated striatum. Effects of NGF on graft survival, fiber growth and rotational behavior. *Exp. Brain Res.* 60, 335-349.
- Stromberg, I., Adams, C., Bygdeman, M., Hoffer, B., Boyson, S. y Humpel, C. (1995) Long-term effects of human-to-rat mesencephalic xenografts on rotational behavior, striatal dopamine receptor binding, and mRNA levels. *Brain Res. Bull.* 38, 3, 221-233.
- Takashima, H., Poltorak, M., Becker, J. y Freed, W.J. (1992). Effects of adrenal medulla grafts on plasma catecholamines and rotational behavior. *Exper. Neurology*. 118, 24-34.
- Takayama, H., Ray, J., Raymond, H.K., Baird, A., Hogg, J., Fisher, L.J. y Gage, F.H. (1995) Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nat. Med.*, 1, 1, 53-58.
- Taylor, J.R., Elsworth, J.D., Sladek, J.R., Collier, T.J., Toth, R.H. y Redmond, D.E. (1995) Sham surgery does not ameliorate MPTP-induced behavioral deficits in monkeys. *Cell Transplant.*, 4/1, 13-26.
- Thompson, W.G. (1890) Successful brain grafting. *N.Y. med. J.*, 51, 701-702.
- Tischler, A.S. y Grenee, L.A. (1980) Phenotypic plasticity of pheochromocytoma and normal adrenal medullary cells. En:Eranko, E., Soinila, S. y Paivarintia, H.(eds.) *Histochemistry and cell biology of autonomic neurons, SIF Cells, and paraneurons*. Raven Press, N.Y.
- Tischler, A., Ruzicka, L., A. Donahue, S.,R. y DeLellis, A. (1989). Cromaffin cell proloferation in the adult rat adrenal medulla. *Int. J. Devl. Neuroscience*. V-7,N-5, 439-448.
- Tomozawa, Y. y Appel, S.H. (1986) Soluble estriatal extracts en hance development of mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Brain Res.* 399, 111-124.
- Torigoe, R., Yoshida, M., Ohtsuru, K., Kuga, S. y Kuramoto, S. (1989). Adrenal medullary graft to brain in 6-hydroxydopamine lesioned rotation rats. Comparison of two different graft sites (striatum versus lateral ventricle) by behavioral observation and fluorescence histochemistry. *Stereotact. Func. Neurosurg.* 54+55, 347-352.
- Ungerstedt, U. (1971)a. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induce degeneration of the nigro-estriatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica Suppl.* 367, 69-93.

- Ungerstedt, U. (1971)b. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. *Acta Physiol. Scandinavica Suppl.* 367, 93-99.
- Unsicker, K., Kirch, B., Otten, U. y Thoenen, H. (1978). Nerve growth factor induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: Impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Sci. USA.* 75, 3495-3502.
- Unsicker, K., Reiffert, B. y Ziegler, W. (1980). Effects of cell culture conditions, nerve growth factor, dexamethasone, and cyclic AMP on adrenal chromaffin cells in vitro. In *histochemistry and cell biology of autonomic neurons, SIF cell, and paraneurons.* (O. Eranko, ed.) Raven Press, New York., 51-59.
- Unsicker, K., Skaper, S.D. y Varon, S. (1985). Development changes in the response of rat chromaffin cells to neurotrophic and neurite-promoting factor. *Dev. Biol.* 111, 425-433.
- Vaquero, J., Martínez, R. y Coca, S. (1990). Graft of adrenal tissue into the nervous system. *Neurosurgery*, 26, 176-180.
- Vuillet, J., Moukhles, H., Nieoullon, A. y Daszuta, A. (1994) Ultrastructural analysis of graft-to-host connections, with reference to dopamine-neuropeptide Y interactions in the rat striatum, after transplantation of fetal mesencephalon cell. *Exp. Brain Res.*, 98, 84-96.
- Walker, P.D., Chavanes, G.I. y McAllister (1987) Identification of acetylcholinesterase-reactive neurons and neuropil in neostriatal transplant. *J. Comp. Neurol.* 259, 1-12.
- Walters, A.M., Clarke, D.J., Bradford, H.F. y Stern, G.M. (1992) The properties of cultured fetal human and rat brain tissue and its use as graft for the relief of the parkinsonian syndrome. *Neurochem. Res.*, 17, 9, 893-900.
- Wang, Y., Wang, S.D., Lin, S.Z. y Liu, J.C. (1994) Restoration of dopamine overflow and clearance from the 6-hydroxydopamine lesioned rat striatum reinnervated by fetal mesencephalic grafts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270, 2, 814-421.
- Watts, R.L., Bakay, R.A.E., Herring, C.J., Sweeney, H.J., Colbassani, H.J., Mandir, A., Byrd, L.D. y Iuvone, P.M. (1990) preliminary report on adrenal medullary grafting and cogafting with sural nerve in the treatment of hemiparkinsonian monkeys. *Prog. Brain Res.* 82, 581-591.
- Victorin, K., Ouimet, C.C. y Björklund, A. (1989) Intrinsic organization and connectivity of intrastriatal striatal transplants in rats as revealed by DARPP-32 immunohistochemistry: Specificity of connections with the lesioned host brain. *Eur. J. Neurosc.* 1, 690-701.
- Winn, P. (1991) Excitotoxins as tools for producing brain lesions. En: Conn, P.M. (Comp.) *Lesions and transplantation. Methods in neurosciences.* Vol. 7. Academic Press, Inc.
- Winn, S.R., Tresco, P.A., Zielinski, B., Greene, L.A., Jaeger, C.B. y Aebischer, P. (1993) Behavioral recovery following intra-striatal implantation of microencapsulated PC12 cells. *Exp. Neurol.*, 113, 3, 322-329.
- Wurtman, R.J., Pohorecky, L.A. y Baliga, B.S. (1972) Adrenocortical control of the biosynthesis of epinephrine and proteins in the adrenal medulla. *Pharmacol. Rev.* 24, 411.

- Yurek, D.M., Collier, T.J. y Sladek, J.R. (1990) Embryonic mesencephalic and striatal co-grafts: Development of grafted dopamine neurons and functional recovery. *Exp. Neurol.* 109, 191-199.
- Zabek, M., Mazurowski, W., Dymecki, J., Stelmachow, J. y Zawada, E. (1994) A long term follow-up of fetal dopaminergic neurons transplantation into the brain of three parkinsonian patients. *Restor. Neurol. Neurosc.*, 6, 2, 97-106.
- Zager, E.L. y Black, P. (1988). Neural transplantation. *Surg. Neurol.* 29, 350-366.
- Zhang, W.C. (1992) Intracerebral cogaft of Schwann's cell and fetal adrenal medulla in the treatment of Parkinson's disease. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih.*, 29, 12, 750-752.
- Zhou, R. C., Buchwald, N., Hull, C. and Towle, A. (1989) Neuronal and glial elements of fetal neostriatal grafts in the adult neostriatum. *Neuroscience.* 30, 19-31.
- Zigmond, M.J., Abercrombie, E.D., Berger, T.W., Grace, A.A. y Stricker, E.M. (1990) Compensation after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends in Neurosc.*, 17, 1211-1214.