

122



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TECNICA DE VIABILIDAD DEL TRANSPLANTE EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LIDIA MARTINEZ PEREZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

297515



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Técnica de viabilidad del trasplante en el Sistema Nervioso Central".

realizado por La alumna Lidia Martínez Pérez

con número de cuenta 8215626-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Luis Camilo Ríos Castañeda

Propietario

Dr. Marco Antonio Martínez Avila

Marco Antonio Martínez Avila

Propietario

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Marcela Esperanza Aguilar Morales

Suplente

I.B.Q. María Cristina Trejo Solís

Ma. Cristina Trejo Solís

Suplente

Biol. Adriana García Alarcón

Adriana García Alarcón

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos Morales



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADEZCO LA COLABORACION DE LAS SIGUIENTES PERSONAS:

Al Dr. René Drucker Colín por haber facilitado su laboratorio en donde se llevó acabo las técnicas Histológicas.

A la Q.B.P. Concepción Rugerio Vargas por su apoyo en las técnicas histológicas argénticas

A la Biol. Yolanda Quintana Rojas por su colaboración en las técnicas histológicas de Nissl.

A la Biol. María de Jesús Ibarra Sánchez por su colaboración en la técnica de disociación del tejido cerebral.

Al Dr. Jorge Julián Palacios Venegas por sus aportaciones teóricas.

Al Dr. Rigoberto González Piña por sus aportaciones teóricas.

Al Biol. Armando Medina por su aportación en la técnica de disociación del tejido nervioso.

A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por su asesoría en el avance de los trámites de esta tesis.

A la Dra. Cristina Trejo Solís porque ha compartido sus ideales para el avance en los trámites de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio Q.F.B. Lucía Yáñez Maldonado y Biol.
Susana Vidrio por su apoyo moral en el avance de esta tesis.

Con especial afecto y agradecimiento al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda por
haber tomado a cargo la dirección de esta tesis, y por su valiosa asesoría.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	2
II.	INTRODUCCIÓN.....	4
	A) Características de la Cápsula Interna.....	7
III.	ANTECEDENTES.....	15
	A) Características de las neuronas embrionarias.....	15
	B) Factores involucrados en el desarrollo de las neuronas.....	16
	C) Transplante de células en el Sistema Nervioso Central.....	20
	D) La hemiplejía como un transtorno motor.....	23
	E) Desarrollo del modelo experimental de hemiplejía.....	24
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
V.	HIPÓTESIS.....	31
VI.	OBJETIVOS.....	32
VII.	MÉTODO.....	33
	A) Determinar la supervivencia de las neuronas embrionarias a diferentes concentraciones de tripsina.....	33
	B) Lesión por aspiración de la Cápsula Interna.....	34
	C) Transplante de células embrionarias.....	36
	D) Tratamiento histológico.....	38
VIII.	RESULTADOS.....	40
IX.	DISCUSIÓN.....	47
X.	CONCLUSIONES.....	52
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	54

I. RESUMEN

La técnica de trasplante con tejido neural embrionario ha sido modificada desde la utilización de bloques de tejido sólido colocados en la zona previamente lesionada. Actualmente muchos investigadores utilizan trasplante de células fetales en suspensión con un buen grado de éxito, en particular en sitios profundos del cerebro. Sin embargo las neuronas injertadas no presentan un alto porcentaje de supervivencia por lo que es necesario establecer un mecanismo de viabilidad antes y después del trasplante.

En este estudio se utilizó un modelo experimental de hemiplejía que consiste en provocar una lesión en la Cápsula Interna (CI) y posteriormente colocar un trasplante de células embrionarias en suspensión en el lugar lesionado, en este estudio fue con el propósito de determinar los factores técnicos que impiden la sobrevivencia de las neuronas embrionarias implantadas dentro del Sistema Nervioso Central (SNC).

Se utilizaron 35 ratas machos de 6 semanas de edad de la cepa Wistar, las ratas fueron distribuidas al azar en 5 grupos: un grupo control (C) que no se le aplicó ningún tipo de lesión; los otros 4, fueron los experimentales subdivididos de la siguiente manera: dos grupos sin lesión: uno con trasplante falso (TF) y otro con trasplante verdadero (TV); los otros dos grupos sí recibieron lesión verdadera (LV) pero solamente uno de ellos recibió trasplante verdadero y al otro en cambio se le aplicó trasplante falso (TF).

Las ratas de los grupos con lesión verdadera se sometieron a cirugía para lesionar intracerebralmente, utilizando el método de succión del parénquima cerebral, con una cánula estéril que se introdujo hasta la región de la CI.

Después de 11 semanas, utilizando el mismo método quirúrgico, los sujetos de los grupos con transplante verdadero y falso se sometieron nuevamente a cirugía en donde se les administró células embrionarias en suspensión, un volumen de 10 μ l para cada sujeto. Los individuos del grupo con transplante falso, recibieron 10 μ l de medio de cultivo RPMI 1640 en el lugar previamente lesionado.

Después de 3.5 meses de recuperación, se sacrificaron los sujetos, después de la perfusión cardiaca se obtuvo el cerebro para su tratamiento histológico posterior con diferentes técnicas de tinción: la argéntica (doble impregnación de Río Ortega) y la de Nissl, se realizó el análisis microscópico del tejido neural que había en ese momento en los sujetos experimentales y controles.

Al analizar ambas pruebas, se encontró un alto porcentaje de neuronas viables, demostrándose evidencias de sobrevivencia del injerto.

Se concluyó, que ésta técnica de transplante proporciona un modelo que puede ser aplicado con éxito en los trabajos de transplante intracerebral.

II. INTRODUCCIÓN

Tomando como base las enfermedades neurológicas que se presentan con mayor frecuencia en los humanos, se han creado modelos experimentales utilizando animales de laboratorio, en donde se reproducen dichas disfunciones, con el objeto de encontrar un camino adecuado para su cura.

Una de las técnicas más novedosas, consiste en someter al sujeto a cirugía para colocarle un trasplante de tejido cerebral embrionario en suspensión, en el área del daño reproducida experimentalmente en el animal. Los reportes sobre la recuperación inducida por los trasplantes de tejido del Sistema Nervioso Central Embrionario (SNCE) al cerebro adulto han ido en aumento día con día, estudiándose desde varios puntos de vista: fisiológicos (AL. Vescovi y col., 1999; B. Will y col., 2000; MC. La Regina y col., 2000; KS. Bankiewicz y col., 2000) y electrofisiológicos (EM Andrews. y col., 2001; YH. Chung. y col., 2001)

Se ha demostrado que con el empleo de modelos experimentales de daño cerebral usando animales de laboratorio, el índice de recuperación es muy alto; tanto en condiciones que siguen procesos naturales que implican a la Plasticidad Cerebral (PC), como también por el desarrollo y empleo de procedimientos terapéuticos (Bach y Rita, 1980b). Dichos modelos se han desarrollado con un doble propósito: por una parte, estudiar los mecanismos naturales de recuperación funcional, y por otro lado observar los índices de recuperación iducida por fármacos o por cirugía (Mullenix y col., 1975; Brailowsky y col., 1986; Brundin y Victorin., 1993; Barker y col., 1993; Janischke y col., 1996; y Saatman y col., 1996).

El incremento de trabajos que emplean modelos experimentales de daño cerebral versa fundamentalmente en dos tópicos: uno, para la evaluación natural de secuelas; otro, por medio del desarrollo de métodos para la evaluación de la recuperación funcional, considerando las posibilidades de extrapolación de los resultados para el posible tratamiento de los seres humanos que tengan esos daños. No obstante que los procesos de recuperación funcional en el Sistema Nervioso (SN) ocurran de una manera pasiva, o bien que sean inducidos por una técnica farmacológica, conductual o quirúrgica. El uso de tales procedimientos como técnicas de rehabilitación o recuperación funcional, depende fundamentalmente de los resultados y de la consistencia de éstos en el manejo de casos similares.

En virtud de que en nuestro país el 10% de la población aproximadamente 8 millones de personas (Ardila-Ostrosky, 1987), tienen necesidad de educación especial y de rehabilitación, después de haber sufrido enfermedades o bien accidentes que les dejan secuelas neuromusculares, con parálisis, como la hemiplejía (parálisis de un lado del cuerpo), la paraplejía (parálisis de ambas extremidades) y la cuadriplejía (parálisis de las cuatro extremidades), por lo que es importante conocer la evolución y los mecanismos terapéuticos que faciliten su tratamiento.

En este contexto una opción viable para el estudio de las lesiones cerebrales sería: hacer el seguimiento de la enfermedad; hacer una prueba para la confiabilidad de los procedimientos terapéuticos que prueben la recuperación funcional después de la lesión cerebral. Los modelos experimentales se han desarrollado con el objeto de estudiar los procesos naturales de recuperación en el SN y poder identificar los recursos o mecanismos naturales con que cuenta el cerebro de los mamíferos

para recuperarse de alteraciones sufridas por diferentes tipos de lesiones.

Los modelos experimentales se han llevado a la práctica empleando diferentes mamíferos, desde la rata hasta el chimpancé (Rosenzweig, 1980).

En la mayoría de los modelos experimentales de alteraciones motoras como el de la hemiplejía se han observado signos de recuperación funcional en el chimpancé (Rosenzweig, 1980); en el humano (Bach y Rita, 1980b); lo mismo se ha reportado en la rata (Palacios y col., 1981; Knight y Brailowsky, 1984; Brailowsky y col., 1986).

Este modelo se caracteriza por una lesión en la vía motora, en nuestro modelo la lesión se ubica en la Cápsula Interna, debido a que las fibras de las motoneuronas que controlan los movimientos que se encargan de mover el cuerpo, los miembros, los ojos, mantener el equilibrio y la postura pasan, por la Cápsula Interna.

El sistema motor transforma la información neural en energía física y esta información es transmitida desde la corteza motora, atraviesa el cerebro y se dirige hacia la médula espinal hasta llegar a los músculos esqueléticos, los músculos transforman esta información en fuerza contráctil que produce los movimientos. La habilidad de los músculos en ejecutar los movimientos dependen de las señales provenientes del área motora que transmite la señal a través de los tractos corticobulbar y corticoespinal, al provocar una lesión a nivel de la Cápsula Interna se altera el control del movimiento de un lado del cuerpo.

A) Características de la Cápsula Interna

Se cataloga a la Cápsula Interna (CI) como la estructura coordinadora de la funcionalidad y de las actividades motoras corporales. Es la vía de la motilidad voluntaria, las fibras que lo componen proviene de las motoneuronas de la corteza motora cerebral, se encuentran agrupadas en varios haces descendentes que atraviesan el cerebro, siguiendo su trayectoria hacia el tronco cerebral, pasa posteriormente a la médula espinal, para terminar en sinápsis con la neurona motora periférica. La motoneurona superior conduce los impulsos del área motriz del cerebro y es la única vía de conexión directa desde la corteza motora hasta la médula espinal, estos sistemas descendentes son la vía final común de los patrones de movimiento. Esta vía está involucrada en la contracción de músculos individuales y es el medio por la cual uno activa cualquier actividad corporal de esa naturaleza (Guyton, 1994) Figura 1.

El paquete de fibras de las neuronas motoras pasa por la CI, el tallo cerebral y la médula espinal por medio de los haces corticobulbar y piramidal a la motoneurona inferior. Las lesiones de la motoneurona superior pueden estar localizadas en diferentes regiones: la corteza cerebral, la CI, el pedúnculo cerebral, el tallo cerebral o en la médula espinal. Estas se pueden deber a diversas causas como: lesiones durante el nacimiento, neoplasias, inflamación, hemorragia, trombosis, procesos degenerativos o traumatismos (Letourneau y col., 1991). Los signos de las lesiones de la motoneurona superior incluyen parálisis espástica (el tono muscular muy disminuido en el lado paralizado comienza a aumentar hasta llegar a la contractura, que afecta a los músculos menos paralizados con hipertonía, exageración de los reflejos y fenómeno de Babinski) o paresia () de los músculos afectados, poca o ninguna

atrofia muscular, reflejos profundos hiperactivos, reflejos superficiales disminuidos o faltantes, y reflejos o signos patológicos. El músculo puede ser incapaz de reaccionar normalmente ante los estímulos que se le aplique, manifestandose así la presencia de una debilidad, parálisis o contracción tetánica (Guyton, 1994).

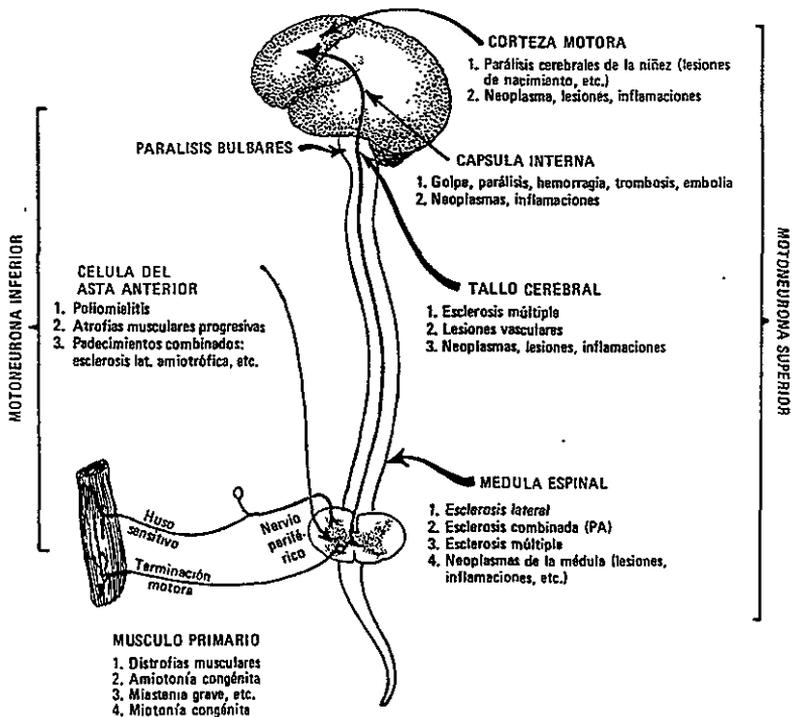


Fig. 1 Esquema de las vías motoras: se señalan las áreas neurales involucradas en la regulación de la actividad motora en el humano.

Tomado de: Guyton, 1994.

Anatómicamente, la CI es un paquete de fibras tanto aferentes como eferentes del neopallium, para su estudio se subdivide en tres partes; a) el brazo anterior: que se encuentra entre la cabeza del núcleo caudado y el extremo rostral del núcleo lenticular. Las fibras tienden a dirigirse rostral y dorsalmente; b) la rodilla: es la región que presenta el ángulo y c) el brazo posterior se compone de tres partes: la lenticulotalámica localizada entre el tálamo y el núcleo lenticular, en el cual las fibras se dirigen casi verticalmente; la parte retrolenticular está localizada detrás del núcleo lenticular por lo que las fibras corren hacia atrás; y la sublenticular, se encuentra localizada debajo de la mitad posterior del núcleo lenticular, en el cual las fibras se dirigen lateralmente (Carpenter, 1994).

Las fibras de la CI se clasifican en dos grupos: las piramidales y las extrapiramidales. Las piramidales son aquellas fibras que emergen de la corteza y descienden por las vías piramidales y terminan en la región de las neuronas motoras alfa. Las fibras extrapiramidales, incluyen los haces descendentes que corren paralela al sistema piramidal. Se ha demostrado que el sistema extrapiramidal regula la actividad muscular de ajuste grueso, es el transfondo del sistema motor y está relacionado con el control del tono muscular y puede funcionar como activador o inhibidor. El sistema piramidal por otra parte estimula la actividad muscular y es el responsable de los movimientos precisos y específicos que son necesarios para toda actividad fina y diestra.

Los sistemas piramidal y extrapiramidal influyen sobre las neuronas motoras inferiores de tal manera que los impulsos voluntarios son modificados y *amplificados*, lo cual da como resultado una respuesta muscular ordenada.

Los impulsos que inician la actividad muscular se originan en la corteza motora, éstos incluyen una parte del lóbulo frontal anterior; al surco central, comunmente denominada corteza motora y también parte del lóbulo parietal. Estas dos regiones se conoce como corteza sensoriomotora e incluyen a las áreas de Brodmann 8, 6 y 4 de la corteza frontal y las áreas 3, 1, 2, y 5 del lóbulo parietal, éstas áreas de la corteza se compone tanto de fibras piramidales como extrapiramidales (House y col., 1982; Barr y col., 1986).

Las fibras piramidales son de dos tipos: corticoespinales y corticobulbares. Las fibras corticoespinales se subdividen en: una vía larga que mide aproximadamente un metro, y está conformada por 1 millón de fibras; de las cuales, el 60 % se origina en las vías frontales y el 40 % restante surge de la corteza parietal. En su mayoría son fibras pequeñas entre 1-4 nm de diámetro y menos del 9 % tienen diámetro mayores, con valores de entre 5 y 10 nm; y el resto, tienen entre 10 a 22 nm, al parecer son fibras de las células de Betz (House y col., 1982).

Todas estas fibras pasan de la corona radiada a la corona posterior de la CI, las fibras que controlan las extremidades superiores se ubican en la porción rostral cerca de la rodilla; las que controlan los miembros inferiores, se encuentran más caudalmente, en el borde rostral del mesencéfalo y se unen con otras fibras corticales dando lugar a la formación de los pedúnculos cerebrales. Las fibras corticales descendentes penetran en el extremo rostral de la protuberancia, a través de la cual descienden en haces irregulares que se proyectan en la porción ventral de la protuberancia, estos haces se combinan y forman las vías piramidales bulbares que se extienden a lo largo de gran parte del bulbo. Inmediatamente encima de la unión medulobulbar, del 85 al 90 % de las fibras abandonan cada pirámide, y se cruzan a nivel de la cisura ventral.

Esto se conoce como decusación motora. Tanto las fibras cruzadas como las directas continúan hacia la médula espinal, para formar terminales motrices: el 50 % de éstas fibras terminan en la región cervical de la médula, el 20 % a nivel torácicos y el 30 % restante continúan hasta las porciones inferiores de la médula espinal. En las regiones lumbar y sacra, se disponen superficialmente sobre el borde lateral del cordón lateral; a éstos niveles, el 10% de las fibras terminan directamente en las neuronas motoras alfa de la lámina 9 de las astas ventrales. Todas las restantes terminan en interneuronas de las láminas 4 a la 7 (House y col., 1982) Figura 1.

Las fibras corticobulbares convergen al pasar a través de la corona radiata para ubicarse en la rodilla de la CI. Continúa hacia abajo y penetran en el pedúnculo cerebral, en donde se colocan medial y dorsalmente a las fibras corticoespinales, pero a la altura del subtálamo se separan en 2 grupos. Uno de éstos, acompaña a las fibras corticoespinales a través de la protuberancia y de las pirámides bulbares, dando lugar a la formación de fibras que se dirigen hacia los núcleos motores a niveles sucesivamente más bajos, algunas continúan más allá de la decusación motora a la médula cervical superior. El otro grupo, se separa de la masa principal, en haces pequeños que van a pasar por la formación reticular; algunas fibras cruzan la línea media y llegan a los núcleos motores del lado opuesto; otros se dirigen a núcleos del mismo lado. Algunas se desprenden del haz piramidal y van a descender principalmente a las regiones del menisco, ellas inervarán las regiones motoras a nivel de los núcleos. Se cree que la mayoría de las fibras corticobulbares terminan en núcleos de la formación reticular, sirviendo las células de esta zona como interneuronas. El resto de los axones utilizan la formación reticular, el fascículo longitudinal medial o el lemnisco medio para llegar a los núcleos motores craneales (House y col., 1982). El fascículo

piramidal es ante todo una vía motora, que gobierna principalmente los músculos flexores, sobre todo a nivel de las extremidades, activando las vías de las motoneuronas alfa y gamma y a la vez inhibe las inervaciones procedente de los nervios antagonistas. La función de la neurona piramidal es la de modular su propia actividad en función de los impulsos que recibe (Guyton, 1994).

Las fibras descendentes, excepto las de la vía piramidal, son consideradas extrapiramidales los que descienden por vías paralelas a la ruta piramidal. Este sistema extrapiramidal hace posible los ajustes posturales esenciales para que se lleve acabo el trabajo del movimiento activo, manteniendo el tono muscular apropiado, tan necesario para facilitar la acción de los músculos. Se cree que las áreas 4 y 6 están especialmente comprometidas en esta vía, con contribuciones menores las áreas 8, 9, 19, 24, 3, 1,2 y 7 (House y col., 1982) Figura 2.

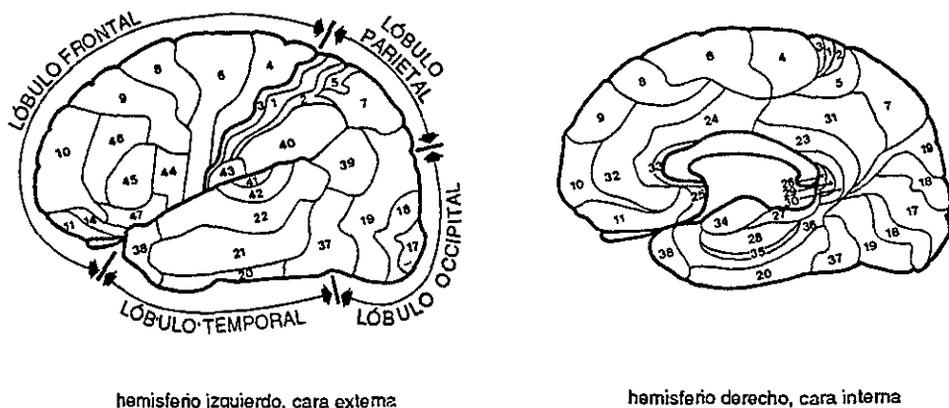


Fig. 2 Mapa de la corteza cerebral establecido por Brodmann en 1909, contiene entre 47 a 52 áreas que se sirven para describir las distintas regiones de la corteza cerebral.

El sistema extrapiramidal presenta dos tipos de fibras; las frontopontocerebelosas y las temporal-pontocerebelosas. Las frontopontocerebelosas emergen de las áreas 4,6 y 10, penetran en el brazo anterior de la CI, atraviesan el el pedúnculo cerebral en su nivel quinto medial y termina en los núcleos protuberanciales ipsilaterales, las fibras que cruzan en la línea media por el pedúnculo cerebeloso medio contralateral hacia el cerebelo (House y col., 1982).

Las fibras termprocerebelosas se originan en las partes caudales de las circunvoluciones temporales media e inferior, penetran en el brazo posterior de la CI a través de la porción sublenticular y descienden en el quinto par lateral del pedúnculo cerebral. Al entrar en la protuberancia, la disposición es la misma que la del grupo frontoprotuberancial. Es el circuito corticopontocerebeloso el que lleva la información sensorial y motriz del cerebelo y actúa controlando la acción muscular voluntaria.

Las motoneuronas especializadas en hacer que los músculos se contraigan, tienen la capacidad de relacionarse en forma activa con el medio externo, a través de los movimientos musculares y se manifiestan de múltiples formas; ya que se encuentran en contacto directo con los músculos, y para cumplir eficientemente esta labor utilizan acetilcolina como su neurotransmisor específico (Darnell y col., 1991). Figura 3.

Neurona motora

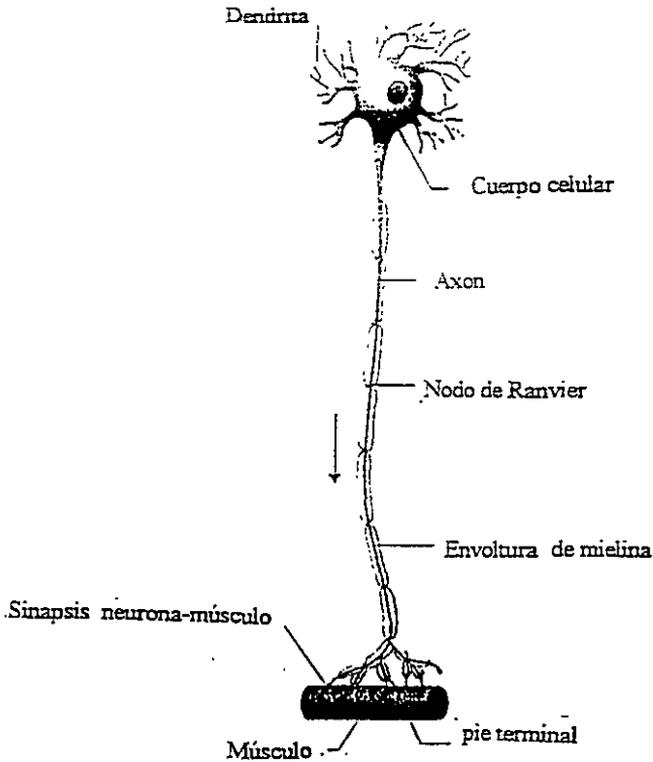


Fig. 3 Se observa una muestra de motoneurona que inerva la célula muscular. Una motoneurona típica, tiene un axón largo que se extiende desde el cuerpo de la célula y se conecta a la célula efectora. En los mamíferos las motoneuronas generalmente están cubiertas de mielina, a nivel de los nodos de Ranvier se hace más delgada; el botón terminal carece de mielina. Esquema tomado de: Darnell, 1991.

III. ANTECEDENTES

A) Características de las neuronas embrionarias

En los mamíferos, el Sistema Nervioso (SN) se forma a partir del ectodermo, a nivel de la línea media dorsal del embrión se forma el tubo neural. Al principio los elementos celulares del tubo no están diferenciados, a la sexta semana (en el caso de los humanos), aparecen diferentes tipos de neuronas y células gliales, cuya función principal es de soporte (Darnell y col., 1991). La neurona madura se desarrolla a partir de una célula precursora relativamente pequeña llamada neuroblasto; el cuerpo celular de un neuroblasto, de 15 a 17 días de gestación mide aproximadamente 15 μm de diámetro (Crutcher y Collins, 1982). Este tipo celular crece, se reacomoda y se divide igual que otras células en las primeras semanas de gestación y deja de dividirse antes de emitir sus prolongaciones características que son los axones y las dendritas; momento generalmente conocido como fase de migración celular, en la que las neuronas inmaduras se asientan en otro sitio. Las neuronas más grandes son las motoneuronas, este tipo de células se diferencian primero. Las neuronas de menor tamaño, generalmente son sensitivas. La mayor proporción de las células gliales se diferencian tardíamente; poco antes del nacimiento del individuo. Las células más nuevas de la corteza cerebral migran desde las capas más profundas a las más superficiales y las neuronas pequeñas del futuro cerebro migran primero hacia la superficie y más tarde a las capas más profundas; este último proceso continúa varios meses después del nacimiento. La pérdida de cualquier neurona ya sea por causas patológicas o naturales, es permanente (deGroot y

Chusid, 1989; Maxwel y col., 1991).

Por regla general, el axón empieza a desarrollarse primero que las dendritas, las dos estructuras se forman a partir del soma de la célula nerviosa. Las prolongaciones emitidas por las células nerviosas embrionarias son difíciles de identificar como axón o como dendrita por lo que las células reciben el nombre de neuritas y a sus prolongaciones se le denomina conos de crecimiento (Tomaselli y col., 1991; Letourneau y col., 1991).

B) Factores involucrados en el desarrollo de las neuronas

Durante la etapa de desarrollo intervienen muchas moléculas importantes para la diferenciación y estructuración del tejido nervioso, las moléculas dependientes de calcio, se les conoce genéricamente como N-CAM (moléculas de adhesión entre neuronas), es una glicoproteína integrada a la membrana y tiene de 720 a 750 aminoácidos, cada molécula de adhesión tiene una distribución característica entre las membranas celulares de los distintos tejidos. Durante la diferenciación, la cantidad o la naturaleza de éstas moléculas varía, afectando en muchos aspectos la adhesión célula-célula y la migración (Brown y col., 1991).

Después de la fertilización y de la fusión de los núcleos gametogénicos; se ha observado que durante el estadio de mórula, la mayor cantidad de moléculas de adhesión celular que se expresan, son las conocidas como ovomorulinas, éstas moléculas son esenciales para la formación de una masa más compacta de células. En un estadio tardío, el ectodermo se invagina para formar el tubo neural entonces las concentraciones de ovomorulina bajan notablemente, y se inicia la síntesis de la N-CAM. Así durante la diferenciación del sistema nervioso, la N-CAM, se convierte en una molécula

de adhesión muy importante. Al tiempo que se forma el tubo neural, se va conformando también la cresta neural. La región del ectodermo que genera a las células de la cresta neural, también pierden las concentraciones de ovomorulina y expresan la N-CAM, sin embargo, la expresión de N-CAM por las células de la cresta neural es solo temporal; cuando las células de la cresta neural inician la migración todas pierden a la N-CAM (Darnell y col., 1991).

Posiblemente todas las proteínas adhesivas de las células son esenciales para su agregación. Una vez que la cresta neural llega a su destino y hallan formado los ganglios ya diferenciados en neuronas, simultáneamente reexpresan la N-CAM, lo cual ayudará a mantener la integridad del agregado celular en varios ganglios.

La neurona inmadura generalmente migra desde su lugar de origen y se va a establecer en otro lugar. Durante su migración el cuerpo celular será guiado en su migración, por células especializadas que se conocen como células gliales radiales. Se considera que estas células tienen su origen en el epitelio columnar del tubo neural, dichas células gliales radiales pueden permanecer por muchos días visibles, en algunas especies hasta por meses. Al término del desarrollo generalmente desaparecen. De este modo, las células gliales radiales intervienen activamente en el proceso de construcción de redes neuronales (Maxwel y col., 1991).

Una vez que las neuritas pioneras “eligieron” una ruta, las otras siguen otras vías de contacto: los conos de crecimiento de las neuritas se extienden hasta hacer contacto con otras neuritas ó con otros conos de crecimiento. Los conos de crecimiento no sólo son guías para la adhesión a la superficie de otra célula, sino que también se adhieren a varios componentes de la matriz extracelular. Durante la formación de las prolongaciones nerviosas existe una

estrecha relación entre el sustrato por donde se desplazan y el medio ambiente externo, las células nerviosas migran a través de las fibrillas con fibronectina, de ésta manera, la célula se desplaza hasta llegar a su destino final (Darnell y col., 1991).

Existen evidencias de que la laminina o un complejo de lamininas y el proteoglicano heparán sulfato juegan un papel crucial en tales guías para la unión a receptores de la matriz extracelular, así como la familia de integrinas, N-CAM y Ng-CAM (moléculas de adhesión entre neuronas y células gliales); que intervienen en la adhesión celular y sirven de guía para el cono de crecimiento en migración (Luckenbill, 1997).

Los factores neurotróficos (FN), pueden servir como sustancias quimiotáctiles para los conos de crecimiento, aunque ellos controlan fundamentalmente la sobrevivencia de los conos de crecimiento, la ramificación de los axones y de las neuronas completas (Loughlin and Fallon 1993). Por ejemplo el control de sobrevivencia de las neuronas del ganglio está determinado de acuerdo a la cantidad de tejido blanco existente, y en gran parte, por el Factor de Crecimiento Neural (FCN), secretado por las células blanco. Durante el desarrollo puede generarse un exceso de neuronas pero después baja la población, la población de neuronas aumenta o disminuye dependiendo de la cantidad de tejido blanco presente en el medio (Darnell y col., (1991).

El contacto que se establece entre un cono de crecimiento con su célula blanco, es un momento crucial para el desarrollo neuronal. Tanto en el cono de crecimiento como en la célula blanco se efectúan transformaciones y se establece una comunicación sináptica, pero el proceso de desarrollo no termina ahí; ya que muchas de las sinápsis formadas inicialmente, son eliminadas, formándose posteriormente una nueva sinápsis con la célula

blanco. Esta remodelación local del patrón inicial de la sinápsis provee una oportunidad para corregir si es que hubiera un error. El sistema está provisto primero de un cono de crecimiento, que funciona como una guía para que migren las neuronas a lo largo de rutas específicas desde el lugar de origen hasta la vecindad de su célula blanco, entonces se forma una conexión sináptica tentativa que permite a las células pre y post-sinápticas comunicarse y finalmente; la conexión inicial es revisada y ajustada por mecanismos que involucran factores neurotróficos (FN) y señales eléctricas en forma de potencial de acción y transmisión sináptica. Este estímulo externo que excita la actividad eléctrica en forma de potencial de acción puede influenciar el desarrollo del patrón de conexión de los nervios (Brown y col., 1991).

Por otra parte las neuritas están programadas genéticamente para hacer conexiones específicas al terminar su crecimiento teniendo así implícita la capacidad de formar redes neuronales, para que las conexiones sinápticas se lleven a cabo exitosamente. El ambiente externo tiene que influir sobre su patrón de desarrollo, en un entorno estimulante que se encuentra sujeto a muchas motivaciones y rico en experiencias se establecerían mayor número de contactos neuronales.

Como ya se mencionó anteriormente; en el embrión, las neuronas que en un principio están separadas, se pondrán en contacto en parte por la migración y también por la formación de finas prolongaciones del cuerpo celular denominadas axones y dendritas. Estas fibras (la dendritas en mayor proporción que los axones), suelen ramificarse repetidas veces y pueden alcanzar zonas del sistema nervioso relativamente distante; o incluso, inervar directamente a tejidos efectores (Brown y col., 1991).

C) Transplante de células en el Sistema Nervioso Central

El tejido cerebral no sobrevive en un transplante, si no es tomado de un organismo en desarrollo embrionario y al final de los ciclos de división celular. Esta condición posiblemente se debe a que las neuronas muy jóvenes están relativamente indiferenciadas. Las prolongaciones celulares pueden dañarse fácilmente en determinados estadios de su desarrollo, y expresarse en un estado más avanzado. El establecimiento de un protocolo de injerto de células embrionarias surge en la universidad de Lund en Suecia, propuesto por Dunnet y Björklund. Estas células son preparadas a partir de fragmentos de tejido nervioso embrionario e inyectadas con una microjeringa directamente en el cerebro del huésped. Este procedimiento tiene la ventaja de que se pueden inyectar en cualquier parte del cerebro; se integran rápidamente en los tejidos del huésped; se establece una relación con la circulación sanguínea, además se facilita la implantación de varios injertos de diferentes células, o las mismas células en diferentes lugares. La colocación de las células en un área específica es muy precisa, y la destrucción del cerebro es mínima, además no es necesario la presencia de un lecho vascular abundante y se puede determinar acertadamente el número de células transplantadas (Björklund y col., 1980a; Smidt y col., 1981).

Cuando se emplea la técnica de suspensión de células, la edad del donador es importante en la supervivencia celular, pues las células tomadas a los 15 días de gestación, tienen un índice de supervivencia más alto que las células de 18 días. Hasta cierto punto, el grado de desarrollo del tejido receptor influye en el éxito del transplante. Si el transplante se lleva a cabo dentro de los primeros días postnatales el crecimiento es mayor (Hallas y col., 1980). Esto podría deberse a que en dicho período, durante el desarrollo

postnatal, el proceso de diferenciación y maduración de las células del cerebro receptor continúa creciendo y en estas condiciones, el cerebro receptor acepta con mayor facilidad células exógenas que tengan propiedades similares (Das y Altman, 1971). Por otra parte el cráneo de la rata sigue creciendo y brinda un mayor espacio para el crecimiento del encéfalo, con células propias y las del trasplante (Das y Hallas, 1978).

La edad óptima del donador sería la correspondiente al período en que las células se encuentran en la etapa de proliferación, migración y el inicio de la diferenciación; para ello sería conveniente que se determinara éste periodo para cada una de las diferentes poblaciones neuronales. Por ejemplo las células de Purkinje que provienen de fetos de 15 días de edad, sobrevive bien; pero mueren si provienen de fetos de 18 días. En este último caso, las únicas células neurales, que sobreviven son las microneuronas del cerebelo que se desarrollan aún después del nacimiento.

La edad del receptor, el volumen del implante, el grado de diferenciación de la estructura huésped, la concentración de los factores tróficos en la estructura que acoge al trasplante; estos factores y otros más, condicionan tanto el grado de sobrevivencia de las células injertadas y de reconexión del sistema receptor así como la expresión funcional de los trasplantes. Una reinervación de la estructura huésped no es una condición necesaria para que un trasplante corrija la disfunción. Los efectos funcionales propios del tejido implantado lo podrían producir, por ejemplo, la secreción de sustancias faltantes al difundirse éstas en las áreas adecuadas del huésped. Ya se ha observado que los trastornos motores inducidos por lesiones en el sistema nigroestriado, pueden corregirse en gran parte mediante trasplante de células procedentes de la misma especie, o de otra especie filogenéticamente cercana, y hasta de células cromafines de médula suprarrenal

de la misma especie. Ese modelo, estudiado de manera especial, reveló, que la corrección funcional inducida por el trasplante depende no solamente del sitio preciso de la lesión, que se podría inducir en la substancia nigra o en el cuerpo estriado, sino que también depende del sitio preciso del trasplante (Brailowsky y col., 1992).

Hoy día existe la hipótesis de que los trasplantes actúan incluso sin conexiones nerviosas específicas. Las células transplantadas (neuronas y glías), podrían liberar factores tróficos y permitir así la sobrevivencia de las neuronas del receptor, que pudiera estar: axotomizadas (pérdida de un axón), diaferentadas (pérdida de las vías nerviosas que llegan a una estructura corporal, desde una célula hasta un tejido) o dañadas (Brailowsky y col., 1992).

La aportación de los factores tróficos liberados por el trasplante también podrían facilitar la gemación de los axones de las neuronas que permanecieron intactas, dando lugar a una inervación más completa. Por otra parte las células injertadas podrían captar y retirar del área de trasplante aminoácidos citotóxicos, o el calcio extracelular en exceso. El tejido fetal puede servir de puente para permitir la regeneración de las fibras lesionadas, las que sin el puente, estarían imposibilitadas de sanar el área lesionada y consolidar la cicatriz glial que linda con ella.

El rechazo del injerto del tejido nervioso es bastante menor que el de otros órganos, por lo tanto el cerebro se considera un sitio privilegiado en el plano inmunitario, esto se debe a que alberga muy pocas células del sistema inmunológico (linfocitos y macrófagos), ya que las moléculas del sistema inmunitario no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, y, finalmente, que las células nerviosas expresan muy pocos antígenos de histocompatibilidad en su superficie. Esas moléculas son los causantes de

toda respuesta de rechazo del injerto (Pardridge, 1993).

La técnica del trasplante constituye una de las herramientas poderosas para ampliar el conocimiento acerca de la integración, la organización así como el conocimiento de las propiedades particulares de las células fetales; por lo tanto el futuro de la técnica de trasplante en el SNC puede proporcionar grandes esperanzas para “curar” y minimizar los trastornos cerebrales (Brailowsky y col., 1992). De este modo el trasplante podría proporcionar un mecanismo de regeneración neural y restablecer las conexiones entre los axones en el SNC del mamífero adulto (Stenevi y col., 1976).

D). La hemiplejia como trastorno motor

La hemiplejia se da a causa de una lesión natural en los humanos, generalmente tiene su origen en alteraciones de la vía piramidal y extrapiramidal, (Noback y Demarest, 1980); puede producirse por enfermedades vasculares del cerebro y del tallo cerebral, traumatismos craneoencefálicos y en menor medida, por tumores cerebrales y procesos infecciosos (Adams, 1970).

La hemiplejia se define como la pérdida de ciertas facultades en la mitad del cuerpo para realizar movimientos coordinados por la musculatura estriada (del tipo esquelético) y que se lleva a cabo por acción voluntaria (Farreras y Rozman, 1976). Cuando esta alteración es debida a una lesión, los efectos inmediatos se detectan por la anulación temporal de los movimientos reflejos tendinosos (arreflexia); tras lo cual, los músculos afectados adquieren un estado de flacidez, y posteriormente se toman espásticos, y el tono

muscular aumenta (hipertonía muscular), evolucionando en paresias (incapacidad funcional motora caracterizada por la disminución de la fuerza muscular y de la pérdida en el control del movimiento); o bien, en parálisis (pérdida completa de la función motora). También se observa un incremento en la resistencia de los movimientos pasivos (signo de navaja) y una disminución de los reflejos cutáneos (Noback y Demarest, 1980). Esa incapacidad se manifiesta principalmente en los miembros superiores, específicamente en los músculos supinadores y extensores; los elevadores del brazo, los extensores de la mano y los oponentes del pulgar. Sin embargo los pacientes pueden girar el brazo hacia adentro y cerrar la mano o coger un objeto opuesto a ella (Farreras y Rozman, 1976).

Por el contrario los músculos de las extremidades inferiores, el iliaco y el cuádriceps permanecen con sus capacidades funcionales; no así los flexores de la rodilla y los que la giran hacia afuera.

E) Desarrollo del modelo experimental de hemiplejía

Las ideas y los conceptos que constituyen el eje del presente trabajo no se desarrollan de manera aislada, sino que son continuidad del pensamiento de grandes investigadores antecesores y contemporáneos que han revelado sus hallazgos positivos desde la década pasada. Gracias a ello hoy en día se conocen diversas técnicas para que casi todas las regiones del neuroeje puedan ser transplantadas con excelentes resultados. Sin embargo, los fundamentos que influyeron en forma decisiva en el desarrollo e implementación de este estudio, se originaron en el conocimiento de un grupo de investigadores, encabezado por el Dr. Arcaráz; el cual lleva más de 15 años de haberse producido. Durante los últimos años, se ha desarrollado un proyecto

encaminado en la búsqueda de un Modelo Experimental de Hemiplejia ; es decir, al análisis de las diferentes estructuras del encéfalo que determinan que una lesión produzca alteraciones motoras en la rata. Inicialmente estos autores abordaron el problema del mapeo de la Cápsula Interna (CI) de la rata Wistar con el objeto de determinar los puntos de control de algunas funciones motoras implicadas en el desplazamiento, para ello se trató de identificar el control motor grueso de extensión, así como el de flexión de las extremidades posteriores de la rata (Palacios, y col., 1981).

Los resultados obtenidos por el grupo mostraron que lesiones en la porción baja de la CI tenía como consecuencia secuelas hemiparéticas y las diferentes extensiones de la lesión llegaron a abarcar hasta el 90% de las fibras de la porción baja de la CI. El tiempo promedio de recuperación de los sujetos fue de 3.5 meses. Otro de los aspectos importantes a resolver, fue el de la evaluación de las secuelas; por lo que se dedicó buena parte del tiempo en la experimentación con animales, a la búsqueda de un sistema de medición más confiable.

Los trabajos experimentales demostraron la extensión del daño necesario para poner en evidencia la parálisis, el reducido tiempo de recuperación, independencia de la extensión del daño y la dependencia del ambiente. Con esta última idea se plantearon preguntas desde el punto de vista experimental como: ¿cuál será la recuperación del daño en diferente tipo de ambiente?. Esta proposición condujo a la revisión de los resultados obtenidos previamente por varios autores (Bach y Rita 1980b y Rosenzweig M.R 1980), acerca del efecto del ambiente de restricción sobre el cerebro intacto y lesionado.

En ese tipo de ambiente, los sujetos tenían acceso al agua y a la comida; pero no podían ejercer movimiento alguno. De ese experimento, surgen varias

preguntas que había que responder claramente para poder desarrollar y perfeccionar el proyecto y las condiciones bajo las cuales se replicaría el paradigma de restricción. Las variaciones serían fundamentalmente en el tiempo: tanto de permanencia en el ambiente restrictivo, como de recuperación post-operatoria. Se observó que una permanencia de 8 días en el ambiente restrictivo provocaba una evolución de las secuelas de la lesión de tal forma que de hemiparesia (parálisis leve que afecta un lado del cuerpo) se convertía en hemiplejia, al mismo tiempo; que los sujetos empezaron a mostrar signos de adaptación después de los 20 días a dicha condición, no murieron y las secuelas fueron mas o menos duraderas y definitivas, mientras que otra parte, de esta muestra experimental perecieron irremediamente.

A partir de estas observaciones se puede decir que la influencia del ambiente es determinante en la recuperación de las secuelas de la hemiplejia. Sin embargo la réplica de este mismo diseño no mostró la misma consistencia en los resultados como lo reportaron Cardona y Varela en 1985 (tesis de licenciatura), teniendo como objetivo principal, el de evaluar la influencia que ejerce la restricción del movimiento sobre las secuelas de daño cerebral motor, producido por la hemiparesia experimental (lesión electrolítica en la CI) en la rata Wistar, reportandose un retardo en la recuperación funcional de la misma.

Esta discordia en los resultados condujo a nuevas investigaciones en la búsqueda de un método de medición y un control más fino sobre la participación de ésta, en la medición de las secuelas de daño y recuperación. Para tratar de establecer la relación conductual con los efectos de la lesión y su ubicación en la región específica del cuerpo del animal, se desarrolló el método del entintado de la Huella de la Marcha de la Rata (EHMR) tomando en cuenta algunos reportes anteriores (Mullenix y col., 1975). Este modelo

consistía en hacer que los sujetos caminaran dejando sus huellas que se analizarían posteriormente. El uso de esta técnica permitió llegar a una medición mucho más sensible, capaz de evidenciar una de las lesiones, cuyas secuelas son gruesas.

Dentro de la misma línea de investigación se iniciaron otros proyectos utilizando parámetros ambientales; siguiendo el procedimiento de los trabajos reportados (Rozenzweig, 1980); se procedió a trabajar con un ambiente rico en estimulación, el efecto de la variación de la dieta de los sujetos; la medición de los efectos de la estimulación temprana y la recuperación del daño, así como la identificación de los efectos del bloqueo de la síntesis de proteínas cerebrales sobre la recuperación de la hemiparesia experimental.

Miranda en 1986, tomando en cuenta los efectos de la deficiencia proteínica en la dieta sobre la recuperación funcional, analizó la deficiencia en el consumo de proteínas en relación con la recuperación de las funciones perdidas por el daño cerebral motor, producida por la lesión electrolítica en la Cápsula Interna (CI) en la rata Wistar; mostrando el sujeto hemiparesia. Reportándose que, en efecto, existe una relación pero esta no impide que se lleve acabo la recuperación, sino que, interfiere en la acción de algunos mecanismos que se ven involucrados con ella, manifestandose en un retardo de la misma. Para la medición de las secuelas de hemiparesia experimental, se empleó como prueba paramétrica, el análisis de la huella de la marcha de la rata (AHMR) reportándose que el método es sensible y confiable para la evaluación y medición del daño cerebral (Placios, 1987b; Varela, 1985 y Miranda, 1986).

En el laboratorio, se han desarrollado investigaciones sobre el modelo experimental de recuperación funcional para las secuelas de la hemiplejía experimental, mediante el injerto intracerebral de células embrionarias de la

corteza motora en suspensión, en receptores adultos. Dicha investigación está orientada en un “modelo biológico” de alteraciones motoras a través de una lesión por succión de tejido en la CI del SNC.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La viabilidad de las neuronas injertadas es un factor importante que condiciona toda recuperación posterior a la lesión, por lo que es de vital importancia establecer un mecanismo de sobrevivencia antes y después del trasplante. Desde 1910, E. Hopkin Dunn, tenía conocimiento del alto índice de viabilidad del tejido neural embrionario después de ser transplantado en el cerebro adulto; cuando se utiliza tejido neural aún indiferenciado (entre los 14 a 17 días de gestación), antes de que se emitan axones y dendritas, para no provocar daños mecánicos durante la disociación. Se sabe que las neuronas embrionarias poseen la capacidad de sobrevivir períodos relativamente más largos de anoxia que las ya diferenciadas. Pese a estos hallazgos, la sobrevivencia de los injertos en el cerebro receptor sigue siendo muy baja, por lo que Dunnett y col., en 1987, establecieron que los obstáculos están relacionados a las condiciones en que se obtienen las células transplantadas y la aplicación de las técnicas para tal propósito.

En este trabajo, el perfeccionamiento de la técnica consiste en probar la concentración de tripsina, a fin de obtener la tolerancia óptima de las neuronas embrionarias, ya que ésta puede ser un factor que acelere la mortalidad, antes de que las células se pongan en contacto con el tejido receptor.

Otro punto importante es idear una técnica de trasplante que asegure la viabilidad de las neuronas dentro del tejido huésped, tomando en cuenta la concentración óptima de tripsina, con la que se debe de disociar el tejido.

La tercera propuesta de rectificar la técnica de disociación, surgió después de conocer la información de un experimento reciente (Custodio y

Piña, 1992). En dicho experimento se observó una gran acumulación de residuos de material en degeneración aunado con una alta reactividad de los astrocitos; de modo que el tejido embrionario no se desarrolló favorablemente en la CI, mostrándose degeneración celular, atribuido a la alta concentración de tripsina, o bien; al daño mecánico provocado por el pipeteo excesivo durante la disociación. Además, cabe la posibilidad de que no se tomara en cuenta, un estricto control de asepsia, vinculado al hecho de que en el área del trasplante se presentó una densa aglutinación de macrófagos.

V. OBJETIVOS

1: Determinar los factores técnicos que impiden el desarrollo de las neuronas embrionarias en suspensión implantadas en el área de la Cápsula Interna.

2: Establecer las condiciones técnicas que optimizan el desarrollo de neuritas dentro de la Cápsula Interna.

VII. MÉTODO

A) Determinar la supervivencia de las neuronas embrionarias a diferentes concentraciones de tripsina:

Para estandarizar la técnica de disociación se realizaron varios ensayos preliminares en los cuales se trató de encontrar la concentración óptima de tripsina que pudieran tolerar las neuritas; una vez obtenido éste dato, se procedió a medir el tiempo de resistencia de las células a esa concentración, dentro de un lapso de 5,10,15 y 20 minutos. Las pruebas se realizaron con tejido neural obtenido de la corteza frontal de fetos de ratas de la cepa Wistar cuya edad variaba entre los 14 a 17 días de gestación, las muestras se tomaron de individuos de la misma camada. Al momento de la extracción, el tejido se mantuvo en solución salina glucosada al 5% a temperatura ambiente.

El tejido se sometió a distintas concentraciones de tripsina (0.0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 y 0.10 %), disuelto en 10 ml de buffer de fosfato con pH 7.4. Se manejó un total de 3 muestras para cada concentración. Para lograr una buena disociación, los tubos se pusieron dentro de un sistema de baño maría con agitación a 75 rpm., a temperatura ambiente durante 5 min.

Se extrajeron las células disgregadas libres de tejido compacto, con una pipeta pasteur y se colocaron en tubos para centrifugarlas por 5 min. a 200 rpm en una centrífuga clínica.

A fin de eliminar hasta el último residuo de tripsina del medio, cada muestra se sometió a tres lavados, después de retirar el sobrenadante, el paquete de células se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo RPMI

1640.

La viabilidad se midió a través de un conteo de las células con un hemocitómetro. Se tomó una alícuota de 20 μ l de cada concentración y se mezcló con 10 ml de azul tripano.

Siguiendo el mismo procedimiento, posteriormente se midió la viabilidad de las neuronas a una concentración de 0.025% de tripsina, en un intervalo de 5, 10, 15 y 20 min., con el objeto de evaluar el tiempo óptimo que pueden tolerar sin dañarse ante dicha enzima.

B) Lesión por aspiración de la Cápsula Interna

Una vez determinada la concentración y el tiempo óptimo que toleran las neuritas en la tripsina, se procedió a realizar la cirugía de lesión utilizando para ello 35 ratas machos, de la cepa Wistar, de 200 g., de 6 semanas de edad, las cuales se seleccionaron y subdividieron azarosamente en 5 grupos de 7 sujetos cada uno, los grupos empleados fueron: sin lesión y sin trasplante (Control), Sin Lesión con Trasplante Falso (SLTF), Sin Lesión con Trasplante Verdadero (SLTV), Lesión Verdadera con Trasplante Falso (LVTF) y Lesión Verdadera con Trasplante Verdadero (LVTV) Tabla 1.

Area de lesión	Tratamiento de cada grupo	Número de sujetos	Sexo	Edad	Peso
Sin lesión	Control	7	Machos	6 Semanas	200 g
	Sin Lesión con Transplante Falso (SLTF)	7			
	Sin Lesión con Transplante Verdadero (SLTV)	7			
Lesión en la Cápsula Interna	Lesión Verdadera con Transplante Falso (LVTF)	7			
	Lesión Verdadera con Transplante Verdadero (LVTV)	7			

Tabla 1. Distribución de los sujetos experimentales para los diferentes tratamientos.

Las ratas de 6 semanas de edad con lesión (LVTF y LVTV) se sometieron a cirugía para lesionar la CI, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60mg/kg) vía intraperitoneal, se rasuró el cráneo y se montó en el aparato estereotáxico (David Koff). La craneotomía se efectuó con un taladro convencional, la CI se removió por aspiración con una cánula de acero inoxidable, guiada estereotáxicamente. El sitio de lesión se ubicó conforme al atlas estereotáxico (Konig y Klippel, 1968) en las siguientes coordenadas: anteroposterior (AP) -0.1, Lateral, (L) - 3.5, y Profundidad (P) -7.3

C) Transplante de células embrionarias

Después de 11 semanas de postlesión, los sujetos destinados a transplante verdadero y falso (SLTF, SLTV, LVTF y LVTV) se sometieron nuevamente a cirugía, para recibir el transplante de tejido embrionario en suspensión, 10 μ l en cada uno de los sujetos. Los animales del grupo con transpalnte falso (SLTF y LVTF) recibieron 10 μ l de medio de cultivo RPMI 1640, en el lugar lesionado, con una microjeringa hamilton montada en una de las torres del aparato estereotáxico. Una vez terminada la cirugía en los dos casos se suturaron las heridas y se colocaron en sus respectivas cajas para su recuperación.

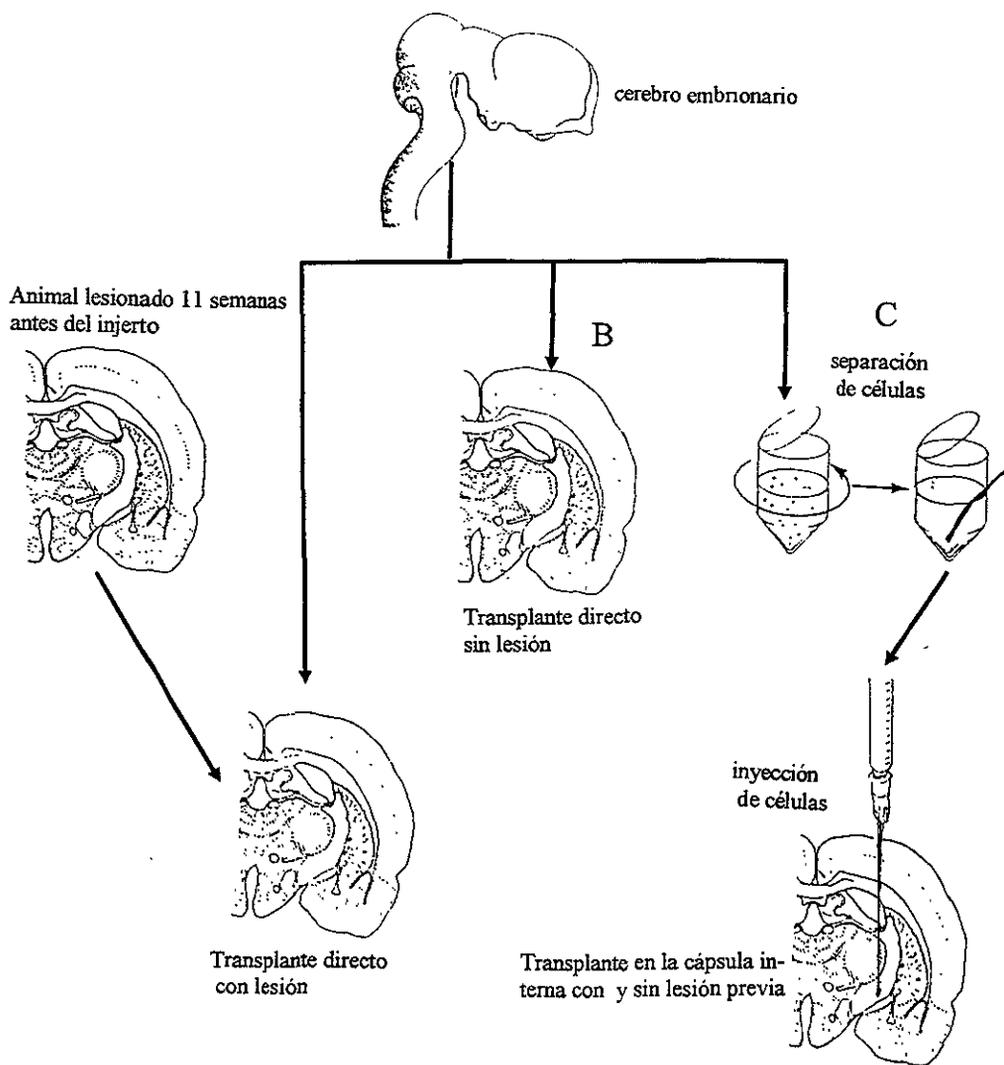


Fig. 4. Esquema general de las condiciones del transplante. A) cerebro lesionado por succión de tejido nervioso unas semanas antes del transplante, con el objeto de preparar la cavidad que alojará al injerto. B) transplante sin lesión previa, las células se transplantaron directamente al cerebro del receptor adulto. El animal recibe el injerto al mismo tiempo que la lesión. C) después de una digestión enzimática las células en suspensión fueron inyectadas en la región de la Cápsula Interna.

Después de 3.5 meses postransplante, se extrajeron los cerebros mediante perfusión cardíaca (Skinner, 1975); para lo cual se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal, una vez expuesta la caja torácica se le suministró intraventricularmente (en el ventrículo izquierdo) 200 ml de solución salina fisiológica y posteriormente 200 ml de buffer de formaldeído 10% con pH neutro. Posteriormente los cerebros recibieron el tratamiento histológico más adecuado, de acuerdo a los objetivos antes planteados.

D) Tratamiento histológico

Para poder observar las características histológicas de los encéfalos utilizados, primero se fijaron en formol para obtener posteriormente cortes de los mismos y darles el tratamiento histológico más adecuado, para poder observar los detalles de interés específico al transplante. Los cortes se trataron con las siguientes técnicas de tinción:

NISSL

Esta técnica se ha empleado para hacer estimaciones cualitativas de la población celular con buenos resultados; con ella fue también posible observar la presencia de cuerpos de nissl en los somas de las neuronas injertadas. Esta estimación de la población sirvió como base para establecer una evaluación del transplante dentro del huésped, relacionándolo con la presencia de substancia de nissl. Esos cuerpos están constituidos por ribosomas aglutinados, su presencia pudo ser interpretada como un indicador de la actividad metabólica de las neuronas transplantadas. figs. 7,8, 9, 10 y 11.

Técnica Argéntica: doble impregnación de Río Ortega

Con esta técnica, también se observaron células nerviosas, vasos sanguíneos y fibras nerviosas; la que puso en evidencia las formas de los somas y número de ramificaciones. Los tipos celulares se clasificaron e identificaron de acuerdo al patrón de sus ramificaciones.

Para el grupo Control se analizaron 10 cortes, el grupo Sin Lesión Transplante Falso 13 cortes, el grupo Sin Lesión Transplante Verdadero 10 cortes, el grupo Lesión Verdadera Transplante Falso 12 cortes y el grupo Lesión Verdadera con Transplante Verdadero 13 cortes, se contó la población celular por campo (área de transplante) de cada una de las laminillas, de acuerdo a sus características estructurales de cada una de las células, de éste modo, se pudo estimar la población sobreviviente y establecer una aproximación de la sobrevivencia del transplante en relación con el número de fibras degeneradas y las fibras normales, el porcentaje de células vivas de cada tratamiento se comparó con el control y con los demás grupos. Con esta información se determinó tanto el grado de muerte celular y el patrón de inervación existente en la Cápsula Interna.

VIII. RESULTADOS

ENSAYO DE DISOCIACIÓN

A los datos obtenidos de la prueba de viabilidad celular in vitro bajo diferentes concentraciones de tripsina, se les dió una representación gráfica en donde la concentración de tripsina aparece como la variable independiente; contra el número de células vivas y muertas presentes en el medio. De éste modo, se pudo encontrar que la concentración óptima a la cual las neuronas embrionarias sobrevivieron en mayor número es a 0.025 %. Los datos se muestran en la tabla 2 y en la figura 5.

[tripsina] %	Num. de células vivas 1×10^4	% de células vivas	num. de células muertas 1×10^4	% de células muertas
0.000	8	54.6	6.0	45.3
0.001	12	53.6	10.6	46.3
0.005	14	55.0	11.0	45.0
0.01	19	49.3	19.0	50.6
0.025	62	54.6	52.0	45.3
0.05	42	39.6	62.0	60.3
0.10	24	36.6	67.0	73.3

Tabla 2.- Datos obtenidos de la prueba de viabilidad de las neuronas embrionarias a diferentes concentraciones de tripsina.

El 45.3 % de las células disgregadas sin tripsina morieron, posiblemente por la agitación mecánica, aún a bajas concentraciones de la enzima la mortandad se mantuvo casi a la par entre el % de células vivas y muertas, a una concentración mayor de 0.025 % se disparó la mortalidad. El número de células muertas aumentó a mayor concentración de tripsina, sin embargo el número de células vivas disminuyó a una concentración mayor de 0.025% por lo que el mayor número de células vivas se encuentra a la concentración de 0.025 % de tripsina.

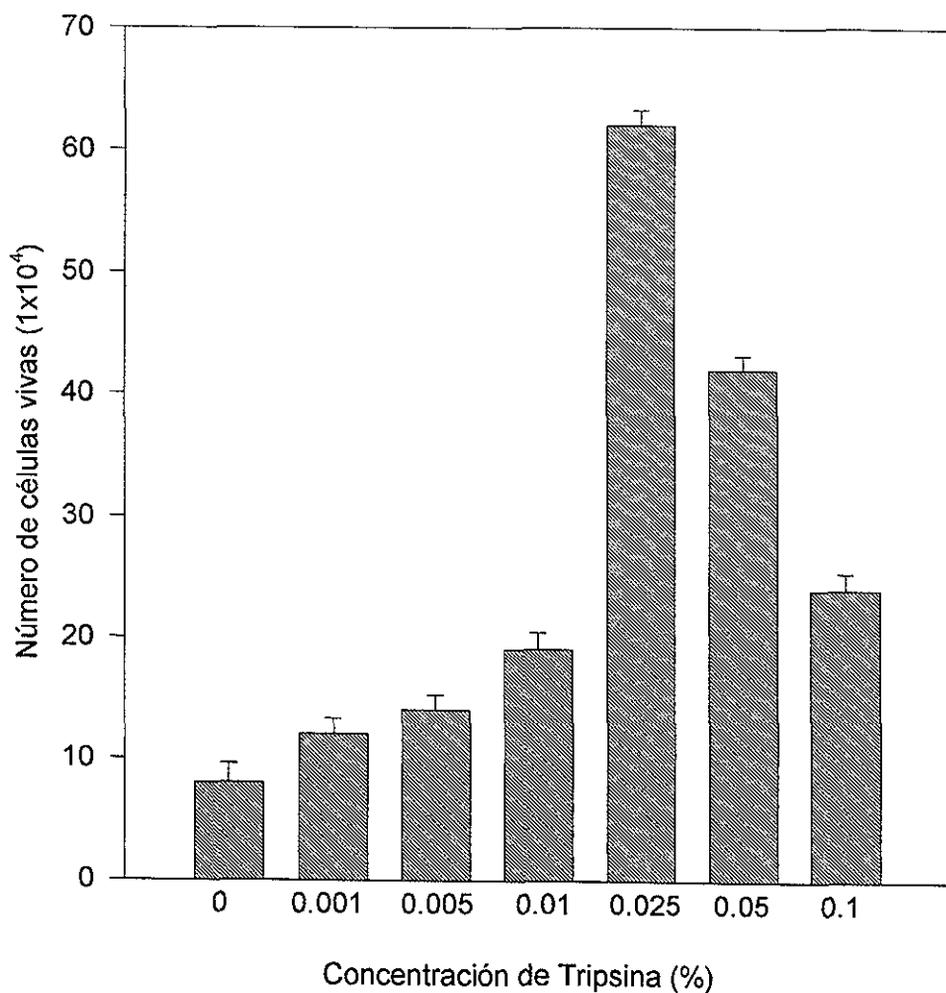


Fig. 5. Viabilidad de las neuronas. Las neuronas fueron disgregadas en diferentes concentraciones de tripsina. Se observa que a la concentración de 0.025% existe mayor sobrevivencia. n=3

TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS A LA TRIPSINA

No se sabía exactamente si la concentración o el tiempo de exposición de las células a la tripsina era el factor decisivo para la supervivencia, por lo que se optó por hacer un ensayo de disociación en un tiempo no mayor de 20 minutos. A los 10 minutos había pocas células disociadas pero en su mayoría viables, a los quince minutos se encontró mayor número de células disociadas, pasado ese tiempo la tripsina resultó ser nocivo para las células.

Las neuronas embrionarias permanecen viables a los 15 minutos de exposición a la tripsina, es posible que a los 10 minutos había mayor número de neuronas vivas sin embargo el tejido no se había disgregado completamente, después de los 15 minutos las células estaban completamente disgregadas pero la tripsina resultó ser nociva para las células. El número de células muertas fue aumentando conforme transcurrieron los 20 minutos de disociación. En la tabla 3 y fig. 6 se muestran los resultados del tiempo de exposición ante la tripsina a una concentración de 0.025 % en un lapso de 5 a 20 min. tabla 3.

[tripsina] %	tiempo min.	num. células vivas 1×10^4	% células vivas	num. células muertas 1×10^4	% células muertas
0.025	5	64.0	72.3	24.0	27.3
0.025	10	64.5	65.0	37.0	36.3
0.025	15	76.0	66.6	38.0	33.3
0.025	20	56.0	42.0	76.3	58.0

Tabla 3.- Se muestra la disgregación de las neuronas y determinación del tiempo de viabilidad celular cada 5 min.

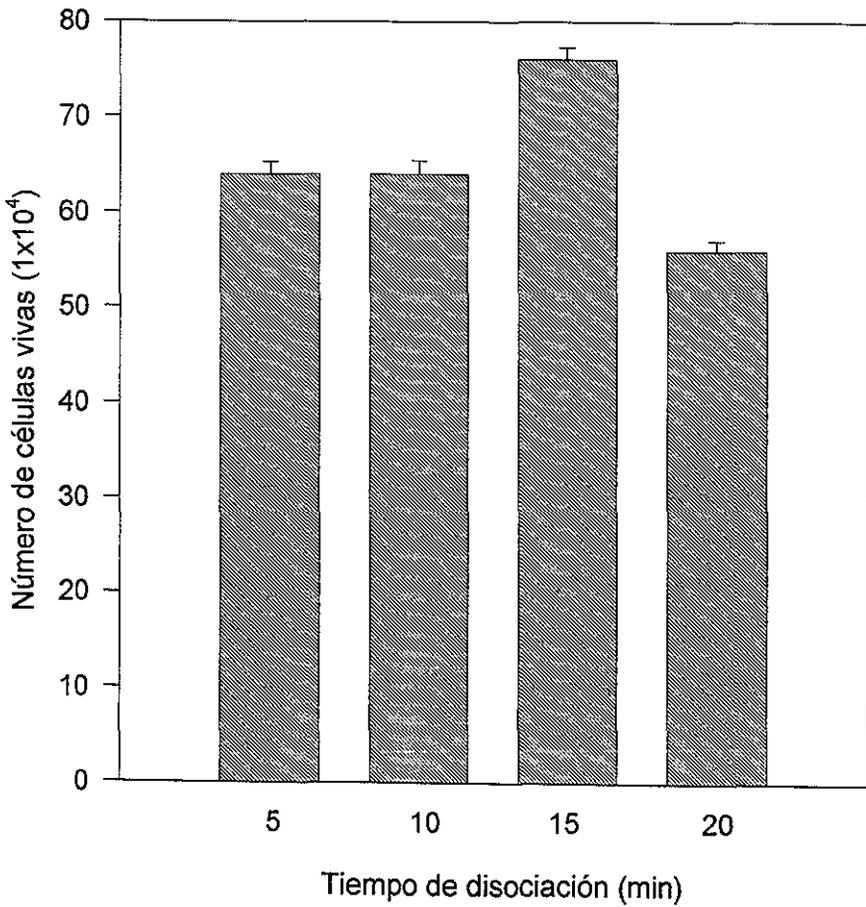


Fig. 6. Viabilidad de las neuronas a diferentes tiempos. Las neuronas fueron disgregadas a una concentración de 0.025% de tripsina y se midió la supervivencia a los 15 minutos. n=3

HISTOLOGÍA

El análisis de las laminillas bajo el microscopio de luz puso en evidencia la supervivencia de las células transplantadas. En la mayoría de los animales con trasplante verdadero revelaron poco orden en la organización interno del tejido en el área transplantado.

El grupo Sin Lesión con Trasplante Falso (SLTF) se observaron células aisladas, no se encontraban bien integradas con el tejido huésped, el área de trasplante se encontraba vascularizada, se observaron algunos macrófagos y escasas neuronas. Cabe mencionar que en los puntos de contacto entre el trasplante y el hospedero no hubo interconexiones y en alguno de ellos presentaban cicatriz glial. En la figura 10 se presenta un corte representativo de este grupo.

El grupo Sin Lesión Trasplante Verdadero (SLTV) presentó mayor cantidad de células que el trasplante falso, también se observaron algunos macrófagos, las células se aglutinaron en la zona de vascularización (Fig. 9).

En tres de las ratas del grupo Lesión Verdadera Trasplante Falso (LVTF), se observaron células en buen estado, la mayoría de los cortes mostraron células supervivientes, sin embargo en uno de los trasplantes se observó degeneración y poca supervivencia de neuronas y uno de ellos sufrió una necrosis total (Fig. 11).

El método de tinción con la técnica argéntica puso en evidencia una gran cantidad de células en el grupo Lesión Verdadera con Trasplante Verdadero (LVTV), muchas de ellas muy pequeñas posiblemente sean células gliales (10 μ m de diámetro), En todos los cortes que se analizaron presentaron supervivencia de neuronas, en general se encontraron neuronas pequeñas, ocasionalmente se veían células de mayor tamaño y en buen estado



FIG. 7. Microfotografía de un corte correspondiente al grupo control. Tratada con la técnica de Nissl; a un aumento de 40x. El tejido intacto muestra una distribución organizada de células en donde se observa una neurona piramidal (NP) y paquetes de fibras nerviosas (PF).

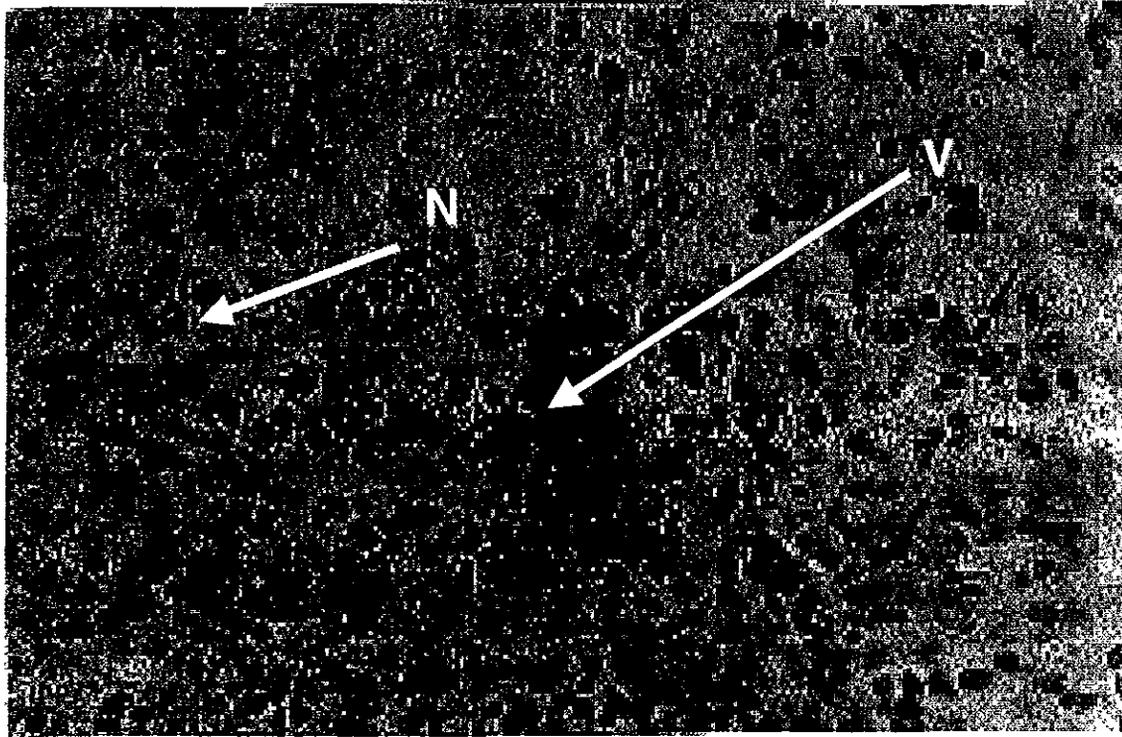


Fig. 8. Microfotografía de un corte correspondiente al grupo con lesión verdadera y trasplante verdadero. Teñido bajo la técnica de de Nissl a un aumento de 40x. Se observa una población densa de neuronas de varios tipos esféricas, alargadas, distribuidas en forma desorganizada, presenta abundante vascularización.



Fig.9. Microfotografía de un corte correspondiente al grupo sin lesión y con transplante verdadero. Teñidas con la técnica de Nissl, a un aumento de 40x. En este caso la sobrevivencia de neuronas es considerablemente alta, sin embargo no supera al grupo lesión verdadera transplante verdadero. En este caso también se observan Macrófagos (M).

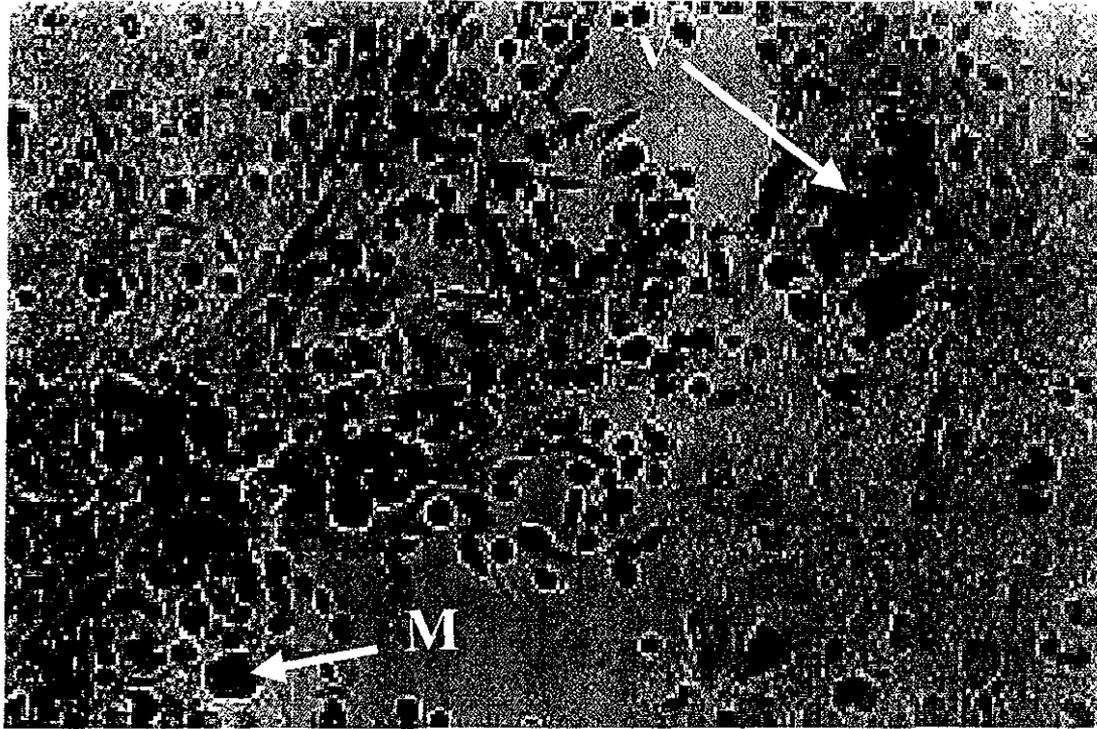


Fig.10. Microfotografía correspondiente al grupo sin lesión y con transplante falso. Teñidas con la técnica de Nissl, a un aumento de 40x. Se observa una clara escasez de células. El tejido local trata de llenar el espacio. presenta áreas de vascularización (V) y macrófagos (M).

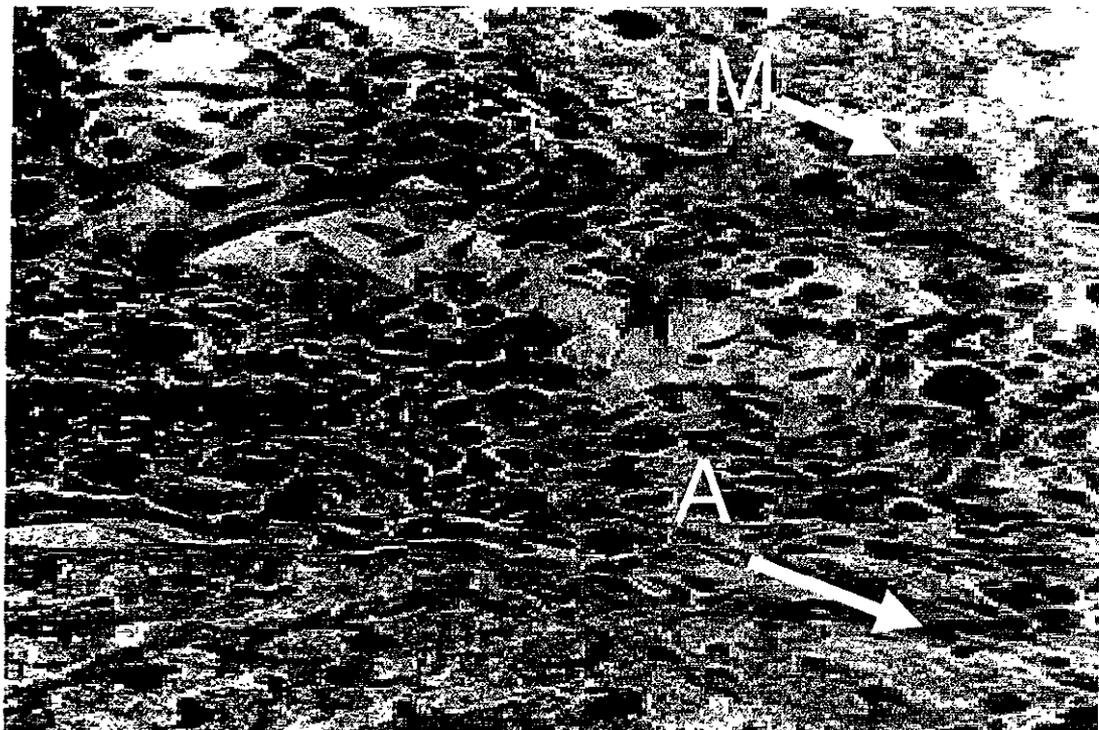


Fig. 11. Microfotografía de un corte correspondiente al grupo con lesión verdadera y trasplante falso. Teñida con la técnica de Nissl, a un aumento de 40X. Las células se disponen de manera desorganizada y dispersa, se aglutinan alrededor de los vasos sanguíneos. Se observan Macrófagos (M) y Astrocitos (A)

ninguna infiltración de células del sistema inmune alrededor del injerto.

El examen general en el área del trasplante confirmó que todas las áreas de lesión con trasplante verdadero se encontraban íntegros, lo cual pudo indicar que las fibras que se desarrollaron en el área de lesión dentro del hospedero hicieron contacto con el tejido adyacente. Figura 8.

Tabla 4. Evaluación histológica de los trasplantes

Estructuras observadas	Tratamiento				
	C	SLTF	SLTV	LVTF	LTVV
Cantidad de neuronas	++++	+	+++	++	++++
Células gliales	++++	++	+++	++	++++
Vascularización	-	+++	++	++	+++
Macrófagos	-	++	+	+	+
Necrosis	-	+	-	+	-
Conexión con el tejido huésped		-	+++	++	++++

Nota: En esta tabla se muestra los resultados cualitativos obtenidos a partir de los cortes histológicos bajo el microscopio de luz para los diferentes tratamientos. Los signos ++++ indican el 100%; +++, 75%; ++, 50%; +, 25%; -, no se observó.

IX. DISCUSIÓN

En trabajos previos a este estudio, realizados por Custodio y González, (1992), se observaron una recuperación funcional pasiva a nivel conductual, los sujetos experimentales adquirieron un mejor desempeño en la estimulación del movimiento después del trasplante. Todos los autores reportaron una clara evidencia en el buen desempeño en las tareas de la fuerza motriz antes de

la lesión; después de la lesión, la actividad muscular decae y en el caso del ambiente enriquecido, la recuperación puede verse a los 75 días después de efectuado el daño. Sin embargo con esos experimentos no fue posible caracterizar a nivel anatómico la sobrevivencia del trasplante; el grupo con trasplante verdadero (TV), se recuperó en menor grado que el grupo recuperación pasiva (RP) y trasplante falso (TF), ésto sugiere que las células transplantadas no fueron viables, ya que después del análisis microscópico de la zona del trasplante, se encontró una cicatriz junto con una invasión de macrófagos, es posible que las neuronas que se encontraban bastante dañadas al momento de introducirse al tejido huésped, fueran atacadas por los macrófagos.

Con base en los resultados mencionados en la tesis de 1992, se planteó la necesidad de estandarizar la técnica de disociación. De acuerdo a las técnicas manejadas con anterioridad (Björklund y col., 1980^a; Dunnet y col., 1982), en la cual se utilizaron un ensayo de disociación con neuronas fetales “en diferenciación” que conformarían posteriormente diversas regiones encefálicas de tejido nervioso como son: primordios del hipocampo, cuerpo estriado y tallo cerebral; de algún modo quienes fueron más resistentes que otras al daño mecánico producido por el manejo técnico, como son: el pipeteo durante la disociación y el proceso de disgregación con la tripsina; estos resultados pusieron en evidencia que las neuronas que más tarde formarán parte de diferentes regiones cerebrales, tienen un diferente grado de resistencia a los daños mecánicos durante el proceso de disociación. A partir de estos antecedentes surge la idea de repetir este ensayo utilizando primordios de corteza motora, disociando a las células con diferentes concentraciones de tripsina y tomando el tiempo de tolerancia del tejido a esa concentración y; en base a estos resultados proseguir con los trabajos de trasplante.

Para ello fue necesario tomar en cuenta la edad del donador, otro factor muy importante en la técnica de los trasplantes, los trasplantes recomendado por destacados neurofisiólogos (Drucker y col., 1984; Dunnet y col., 1987; Björklund y col. 1980a; Smidt y col. 1981); los cuales aseguran que es posible hacer trasplantes de células en suspensión en regiones profundas del cerebro, la destrucción del tejido receptor es mínima y la colocación de las células en un área específica debe ser muy precisa; además, no es necesario la presencia de un lecho vascular abundante; y además es posible determinar acertadamente el número de células transplantadas. Cuando se emplea la técnica de disociación, las células tomadas de donadores de 15 días de gestación tienen mayor índice de sobrevivencia (Das y Hallas, 1978).

La mayoría de los autores coinciden en recomendar para este tipo de trasplante, tejido neural obtenido de ratas de 15 días de gestación, ya que muestra mayor crecimiento después de ser transplantado en comparación con el tejido obtenido de las ratas gestantes de 21 días de edad. Esto puede deberse a que en ese período de desarrollo, el tejido se compone principalmente de células neuroepiteliales que continúan proliferando después del trasplante. A los 18 días de gestación el tejido está conformado principalmente por neuroblastos; que después del trasplante, se diferencian sin proliferar (Das y Hallas, 1978; Kromer, 1986). Sin embargo hay que tomar en cuenta que no todas las áreas del Sistema Nervioso (SN) en desarrollo maduran simultáneamente; por lo tanto, aunado con la edad gestacional, se debe considerar también el nivel de maduración del área de interés.

Tomando en cuenta estos parámetros, fue necesario establecer un diseño experimental que permitiera llevar un estricto control de la edad gestacional de los sujetos donadores, controlados por el propio

experimentador.

Con el fin de identificar la población celular y las conexiones que se establecieron entre el trasplante y las diferentes estructuras celulares del tejido huésped, se emplearon técnicas histológicas de tinción como la de Nissl, así como la doble impregnación argéntica de Río Ortega (Río Ortega. Cajal R.S. 1972).

Las microfotografías del tejido con tinción de Nissl de las ratas lesión verdadera trasplante falso (LVTF), demostraron que en el área del trasplante, las células se encontraban en forma desorganizada, ó bien en forma dispersa; también se pudieron observar algunas aglutinaciones alrededor de los vasos sanguíneos, todo parece indicar que en una lesión sin aporte de células, los macrófagos tratan de recuperar el daño abarcando mayor área de contacto, conformando una cicatriz para llenar el espacio de la lesión junto con la glía, como se observa en la fig. 11. Se aprecia una gran cantidad de células alargadas (P.R. Wheeler, et al., 1987) que son los astrocitos, contienen paquetes de microfilamentos intracelulares particularmente prominentes, este tipo de astrocitos representan un alto porcentaje dentro de las células gliales y tienen un importante papel en la reparación del SNC después del injerto, o bien por algún daño causado por enfermedades. También se encuentran algunas células de microglía que seguramente invadieron después de provocar el daño, para tratar de fagocitar las sustancias introducidas como el trasplante falso. Después del daño celular, se inicia una secuencia de eventos que incluyen degeneración de tejido local y transectos de fibras nerviosas, así como la proliferación de la glía; síntesis de componentes de la matriz extracelular, invasión de macrófagos y la remoción de desechos celulares (Bandtlow, 1993).

Cuando estos eventos ocurrieron en el tejido huésped en los trasplantes

falsos y no se le proporcionó el substrato adecuado para la restauración, el cerebro hospedero inicia el proceso de recuperación, lo que indica que el tejido receptor fue capaz de recuperarse ante el daño inducido por la lesión (Bandtlow, 1993). figura 11.

Los tratamientos del SLTF no fueron particularmente diferentes de los del grupo con LVTF, hubo escasez de células, muy pocas neuronas en las áreas adyacentes, en este caso el daño fue en menor grado, después de este daño el tejido local trata de “llenar” el espacio, lo que conlleva la serie de eventos postlesión (Giland, 1996). La posibilidad de una recuperación pasiva total puede ser excluida ya que en los grupos de TF se aprecia menor cantidad de células, lo que indica que un trasplante falso no es suficiente para restablecer una recuperación ante una lesión (Palacios y col., 1987). fig. 10.

Los cortes observados con TV indican una buena sobrevivencia de neuronas, persiste una población densa de neuronas de varios tipos, las hay esféricas, ocasionalmente alargadas, azarosamente distribuidas en forma desordenada con abundante vascularización, pocos elementos gliales y un incremento de fibras (Dunnet y col., 1982).

Un minucioso análisis histológico reveló que las células transplantadas se encuentran en buen estado, de aspecto normal, las neuronas ovoides presentan núcleos de entre 5-7 μm a 40 X, tanto en la técnica argéntica como en la de Nissl, aunque la mayoría de las neuronas presentes son pequeñas, ocasionalmente las hay de 7-12 μm que son las de mayor tamaño. fig. 8 y 9.

La estructura interna del injerto se presenta desorganizada. La sobrevivencia de neuronas se encontró en 5 de los 7 animales analizados (71%). La tinción de Nissl reveló un fuerte proceso de regeneración, se observan algunas neuronas inmaduras con bajo número de espinas dendríticas.

Los 4 grupos de animales tratados con y sin lesión, así como los del

transplante falso y verdadero, comparando las imágenes del grupo control, con las estructuras celulares del tejido hospedero sin lesión, se disponen en forma homogénea sin ninguna alteración en la disposición de las estructuras celulares, no existen aglutinaciones como en el caso de TF y TV.

De todos los grupos experimentales, en dos de ellos el de LVTV, SLTV se observó que el transplante se ubica a nivel de la corteza junto al cuerpo calloso. El grupo LVTF llega al Putamen Caudado casi al inicio de la CI, solo en el grupo SLTF toca la región anterior de la CI, de acuerdo a los datos al seguir y marcar en ellos las coordenadas utilizadas para la lesión e implante de los atlas estereotáxicos del encefalo de la rata (Konig y Klippel, 1968); esto indica que se requiere de una corrección en las coordenadas estereotáxicas de la profundidad y que para ello es necesario probar diferentes profundidades mayor a la utilizada en este estudio para que el transplante sea depositada exactamente en la CI.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo con los ensayos realizados previo al transplante, en éste estudio en particular se concluye que: es posible obtener mayor cantidad de neuronas viables disociando el tejido embrionario a una concentración de 0.025 % de tripsina.

Las células en suspensión debe obtenerse disociando el tejido en tripsina a una concentración de 0.025% en un tiempo no mayor de quince minutos.

La edad del donador debe ser de 14-17 días de gestación, cuando se emplea la técnica de disociación de células, la edad del donador es un factor

muy importante ya que a esta edad tienen mayor índice de supervivencia.

Las microfotografías de los cortes histológicos revelaron que las coordenadas estereotáxicas de profundidad tomadas del atlas de König y Klippel, (1968) no llegó a la Cápsula Interna (CI). El trasplante sobrevivió a nivel de la corteza junto al cuerpo calloso, sin embargo éste hecho no invalida la supervivencia y la reconstrucción fisiológico del cerebro bajo estas condiciones técnicas.

Habría que refinar el modelo localizando las coordenadas de profundidad para obtener una respuesta adecuada y definitiva para trabajar en el área exacta que se pretende utilizar como Modelo Experimental de Hemiplajia para obtener un daño cerebral “reparado”.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ **Adams, R.D.** (1970). Parálisis motora. *Medicina Interna*. Harrison et al. Prensa Médica Mexicana.
- ◆ **AL. Vescovi, A. Gritti, R.Galli, EA. Parati.** (1999). Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotencial embrionic human CNS stem cells. *J. Neurotrauma* 16 (8): 689-93.
- ◆ **Ardila, A. y Ostrosky-Solís F.** (1987). Daño Cerebral: Un enfoque Neuropsicológico. Trillas, México. pp 98-120
- ◆ **Böjorklund, A., Dunnett, S.B., Stenevi, U., Lewis, M. E., & Iversen, S.D.** (1980a). Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.* 199:307-33.
- ◆ **Bach y Rita, P.** (1980b). Brain Plasticity as a Basis for Therapeutic Procedure. In Bach-Rita. (Ed)., Recovery of function: theoretical considerations for brain injury rehabilitation. Viena: *Hans Huber*, 225-263.
- ◆ **Bandtlow E. C.** (1993). Axonal regeneration in the adult vertebrate CNS. *The Neurosciences*, 5: 391-399.
- ◆ **Barker, A. R., Dunnett B. Stephen and Fawcett W. James.** (1993). Neurotropic factors and neural grafts: a growing field. seminars in *The Neurosciences*, 5: 431-441.
- ◆ **Barr, L. Murray y Kiernan A. John.** (1986). El Sistema Nervioso Humano. *Harla*, México.
- ◆ **Brailowsky, S., knight T. Robert and Efron Robert** (1986). Phenytoin Increases the Severity of Cortical Hemiplejia in Rats. *Brain Res.*, 376: 777.
- ◆ **Brailowsky, S., stein G. Donald and Will B.** (1992). *El Cerebro*

Averiado: Plasticidad Cerebral y recuperación Funcional. F.C.E., México.

- ◆ **Brown, M.C., Hopkins W. G. & Keynes, R. J. (1991).** *Essentials of Neural Development.* Press Syndicate of the University of Cambridge, N.York
- ◆ **Brundin, P. and Klas Victorin (1993).** Modelo Experimental en ratas en Parkinson y Huntinton. *Seminars in the Neurosciences*, 6: 413-421.
- ◆ **B. Will, C. Kelche, JC. Cassel. (2000).** Intracerebral transplant and memory dysfunction: circuitry repair or functional level setting?. *Neural Plast.* 7 (1-2): 93-108.
- ◆ **Cajal, S.R. Castro, F. (1972).** *Elementos de técnica micrográfica del Sistema Nervioso.* Ed. Salvat, España
- ◆ **Cardona, S.A. & Varela, R.C. (1985).** Efectos de la Restricción de Movimiento sobre la Hemiplejia Experimental en ratas. México. Facultad de Psicología, UNAM.
- ◆ **Carpenter, B. Malcolm. (1994).** *Neuroanatomía.* Panamericana, México.
- ◆ **Crutcher, K.A. & Collins. (1982).** In vitro Evidence for distinct Hipocampal Growth Factors: Basis of Neural Plasticity. *Science*, 217: 6768.
- ◆ **Custodio, R. V. y González, P. R (1992).** *Caracterización Conductual y Anatómica de la recuperación Funcional Pasiva y la Inducida por Transplante de Tejido Neural Embrionario en Ratas con Hemiplejia Experimental Mantenido en ambiente Enriquecido.* Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM. Mex.
- ◆ **Darnell James, Lodish Harvey, Baltimore David. (1991).** *Molecular cell Biology.* Ed. Cientific American Books, Inc.
- ◆ **Das, G.D. and J. Altman. (1971).** Transplanted precursors of nerve cells: Their fate in the cerebellum of young rats. *Science*, 173: 637-638.

- ◆ **Das, G.D. and B. H. Hallas.** (1978). Transplantation of brain tissue in the brain of adult rats. *Experientia*, 34: 1304-1306.
- ◆ **DeGroot, J.G. Chusid.** (1989). *Neuroanatomía Correlativa*. El Manual Moderno. S.A. México. 6-7 pp.
- ◆ **Drucker, C.R. Aguilar R.R., García H. F. Fernández C.F. and Bermúdez R. F.** (1984). Fetal Suprachiasmatic Nucleus Transplants: diurnal rhythm Recovery of Lesioned rats. *Brain Res.*, 311:353-357.
- ◆ **Dunnet, S.B., Whishaw I.Q., Bunch S.T., A Fine.** (1987). Acetylcholine Rich Neuronal Graft in Forebrain of rats: Effects of enviromental enrichmen, Neonatal Noradrenaline Depletion, Host transplantation site and regional sourse of embrionic donor cell on graft size and acetyl cholinesterase-positive fibre outgrowth. *Brain Res.*, 378: 357-373.
- ◆ **Dunnet, S.B., G.H. Gage, A. Björklund, U., Stenevi W.C. Low & Iversen, S.D.** (1982). Hipocampal Deafferentiation: transplant-derived reinnervation and funtional recovery. *Scand. J. of Psychol., suppl.*, 1: 104-111.
- ◆ **EM. Andrews, DL. Kuncze,** (2001). Voltaje Gated k (+) chanelns in chemoreceptor sensory neurons of rat petrosal ganglion. *Brain Res.* 897(1-2) 199-203.
- ◆ **Farreras, V.P., & Rozman, C.** (1976). *Medicina Interna*. Marín, S.A., México.
- ◆ **Giland, G.M., Domay M. Varon L.E., Gilad V.H.** (1996). Polyamines Survival and Regeneration of Simphathetic Nevrons. In Gilad G.M., Kreutzberg GM (eds): Presses of Recovery From Neural Trauma. New York, Springer-Verlag, pp 300-306.
- ◆ **Guyton, C. Arthur.** (1994). *Fisiología y Fisiopatología*. Interamericana.

México.

- ◆ **Hallas, B.H., G. D. Das and K.G. Das.** (1980). Transplantation of brain tissue in the brain of rat. II. Growth characteristics of neocortical transplants in host of different ages. *American Journal of Anatomy*, 158: 147-159.
- ◆ **House, E. Lawrence . Ph. D., Pansky Ben, M.D., Ph. D. Siegel Allan, Ph D.** (1982). *Neurociencias*. Ed. McGraw-Hill, México.
- ◆ **Janischke, A. Klaus, Martínez Julio., Visvesvora S. Govinda and Schuster Frederick.** (1996). Animal Model Balamuthia Mandrillaris CNC infection: Contrast an comparison in Immunodeficient and Immunocompetent Mice: A Murie Model of “Granulomatous “ Amebic Encephalitis. *Journal of Neurology and Experimental Neurology*, 55: 815-821.
- ◆ **Knight, R.T. and Brailowsky S.** (1984). Possible role of dopamine in the functional recovery from hemiplegia in aged rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10: 448.
- ◆ **Konig, J. F., and Klippel R. M.** (1968). *The Rat Brain a Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower parts of the Brain stem.* Baltimore Williams & Wilkins.
- ◆ **Kromer, F. L.** (1986) Nerve Growth Factor Treatmen After Brain Injury Prevents Neuronal Death. *Science*. 235: 214-216.
- ◆ **KS. Bankiewicz, J. Bringas, P. Pivrotto, E. Kutzscher, D. Nagy, ME. Emborg.** (2000). Technique for bilateral intracranial implantation of cells in monkeys using an automated delivery system. *Cell Transplant* 9(5): 595-607.
- ◆ **Letourneau, C. Paul, Kater B. Stanley & Macagno R. Eduardo.** (1991). *The Nerve Growth Cone.* Raven Press, New York.

- ◆ **Loughlin E. Sandra and Fallon H. James** (1993). *Neurotrophic Factors*. Academic Press, Inc. New York.
- ◆ **Luckenbill, Louise.** (1997). Laminin and the mechanism of neural outgrowth. *Brain Res. Rev.*, 23: 1-27.
- ◆ **Maxwell, W. Cowan, Shooter M. Eric, Stevens F. Charles and Thompson F. Richard.**(1991). *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 531-70.
- ◆ **Miranda, R.M.** (1986). *Efecto de la Deficiencia proteica sobre la recuperación de funciones perdidas por el daño cerebral motor*. México. Facultad de Psicología. UNAM.
- ◆ **Mullenix, P. Norton S., & Culver, B.** (1975). Locomotor Damage in rats after X-irradiation in utero. *Exp. Neurol.*, 48: 310-324. New York & London.
- ◆ **MC. La Regina, VO. Culbreth, R. Higashikubo, JL. Roti Roti, DR. Spitz.** (2000). An alternative method to stereotactic inoculation of transplantable brain tumours in large numbers of rats. *Lab. Anim.*34(3): 265-71.
- ◆ **Noback, C.R., & Demarest, R. J.** (1980). *Sistema Nervioso Humano*. Fundamentos de Neurobiología. Mcgraw Hill, México.
- ◆ **O. G. Nilsson, P. Brundin, H. Winder, R. E. Strecker and A. Björklund** (1988). Human Fetal basal forebrain neurons grafted to the denervated rat hippocampus produce an organotopic cholinergic reinnervation pattern. *Brain Res.* 456: 193-198.
- ◆ **Palacios, V. J. J., Corral, V. Miranda, R., & Varela.** (1981). *Modelos Experimentales de Daño Cerebral*. Acta Psicológica Mexicana. 1: 25-42.
- ◆ **Palacios, V.J.J.** (1987). *Medición de las Secuelas de la Hemiparesia Experimental*. Master Degree Dissertation. México. Facultad de Psicología,