



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS  
DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCALES  
EMBRIONARIAS EN LA SUSTANCIA NIGRA  
DE RATAS NEONATAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA:**

**NATLLELY GARCÍA CARREÑO**

**TUTOR. DR. J. IVAN VELASCO VELÁZQUEZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA

MÉXICO, D.F. 2009



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.

## **TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS EN LA SUSTANCIA NIGRA DE RATAS NEONATAS.**

Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. J. Ivan Velasco Velázquez en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. J. Ivan Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM.
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACyT, National Institutes of Health, Fundación Alemán y Papiit IN224207 (UNAM).

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día:

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

<b>Presidente:</b> Dra. Hilda Lomelí Buyoli	Instituto de Biotecnología, UNAM.
<b>Vocal:</b> Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM.
<b>Secretario:</b> Dra. María de Lourdes Massieu	Trigo Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
<b>Suplente:</b> Dra. Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
<b>Suplente:</b> Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultad de Química, UNAM.

## **- AGRADECIMIENTOS -**

*A toda mi familia, especialmente a mi mamá, por todo el apoyo brindado. A mis hermanos, por impulsarme y ser el mejor ejemplo a seguir. A mis sobrinitas: Andreita y Mari Fer por regalarme su alegría y ganas de sonreír.*

*A todos los compañeros del laboratorio: a Emmanuel por enseñarme a operar, a Fabián, por ayudarme con los cultivos, a Itzel por aguantarme y escucharme, a Gris, Rodrigo, Frika, Nidia y Ana por compartir tantos gratos momentos y, en especial, al Dr. Ivan Velasco por la dirección del trabajo de tesis, por su paciencia y comprensión.*

*A Sandra (Chispita) y a Bety por impulsarme a seguir adelante y por su gran apoyo y compañía,*

*A Nieves, por apoyarme en los momentos más difíciles, por tenderme la mano incondicionalmente y por brindarme sabios consejos y amable compañía.*

*A mis grandes amigos y compañeros de la facultad: Chayo, Gustavo, José, Rocío, Joñoño, Lilián, Salomé, Abi, KochiQ, por los gratos momentos y largas noches de compañía que fueron de gran ayuda después de meses de extenuante trabajo.*

*A Frida, mi alumna estrella, por impulsarme y hacerme leer cada día más sobre diferentes temas y por haber enriquecer mi conocimiento en numerosas ocasiones.*

*A todos mis compañeros de  $\mathcal{G}UJF$ , en especial a los tres zapotes: Javier, Genaro, y, muy muy especialmente, a Omar por haberme escuchado, aconsejado y hacerme pasar ratos inolvidables.*

*A Juan Carlos y Marco por ayudarme a olvidar problemas, preocupaciones y enseñarme a darle un enfoque diferente a la vida.*

*A Edgar, por ayudarme tantas noches a poner cortes en laminillas y seguir contando con tu compañía y apoyo,*

*Menciono a tantas personas porque sin ellas el desarrollo y trabajo de este trabajo de tesis no hubiera sido igual. Las labores de la ciencia no son fáciles y, a veces, es difícil aprender y tolerar todos los momentos de frustración que están implícitos en este caminar. Gracias a todos porque contribuyeron en algo para la realización de este trabajo.*

*Al CONACYT por la beca de posgrado otorgada.*

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. SISTEMA NERVIOSO	
1.1.1. Formación del sistema nervioso central	4
1.1.2. Formación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	6
1.1.2.1. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas.	6
1.1.2.2. Crecimiento neurítico y arborización de las neuronas dopaminérgicas	8
1.2. CÉLULAS TRONCALES	11
1.2.1. Tipo de células troncales	11
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
3.1. HIPÓTESIS	17
3.2. OBJETIVOS	17
3.2.1. Objetivo general	17
3.2.2. Objetivos particulares	17
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1. ANIMALES	18
4.2. CIRUGÍA ESTEROTÁXICA	18
4.3. BÚSQUEDA DE COORDENADAS PARA LA INYECCIÓN EN LOS VENTRÍCULOS LATERALES, FASCÍCULO MEDIAL Y SUSTANCIA NIGRA	19
4.4. INYECCIÓN DE COLORANTE POR CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	20
4.5. PROCESAMIENTO DEL CEREBRO	21
4.6. ESTANDARIZACIÓN DE LA LESIÓN CON 6-OHDA	21
4.6.1. Inyección de 6-OHDA en ventrículos laterales	21
4.6.2. Inyección de 6-OHDA en fascículo medial	21
4.6.3. Evaluación de la actividad motora	22
4.6.4. Inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa	23
4.7. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS	24
4.8. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS A NEURONAS DOPAMINÉRGICAS	24

<b>V. RESULTADOS.</b>	
5.1. LOCALIZACIÓN DE LAS COORDENADAS PARA DEPÓSITO DE 6-OHDA EN VENTRÍCULOS EN RATAS DE 3 DÍAS PN	26
5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA LESIÓN CON 6-OHDA	27
5.2.1. Correlación entre la inmunorreactividad a TH y la actividad locomotora	28
5.3. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE 6-OHDA EN LOS VENTRÍCULOS LATERALES	31
5.3.1. Correlación entre la actividad locomotora, la denervación dopaminérgica y la conductora de giro de las ratas trasplantadas	31
5.3.2. Localización del trasplante	32
5.3.3. Prueba de rotación	35
5.3.4. Grupo de ratas trasplantadas con células marcadas	36
5.3.4.1. Ratas sacrificadas al día 6 postnatal	36
5.3.4.2. Ratas sacrificadas al día 14 postnatal	37
5.3.4.3. Ratas sacrificadas al día 21 postnatal	39
5.3.4.4. Ratas sacrificadas al día 28 postnatal	40
<b>VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b>	
6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA LESIÓN CON 6-OHDA	41
6.2. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS	43
6.3. CONCLUSIÓN	45
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- 6-OHDA.** 6-hidroxi-dopamina.
- AP.** Antero-posterior.
- CT.** Células troncales.
- CCE.** Células de carcinoma embrionario.
- CGE.** Células germinales embrionarias.
- CTE.** Células troncales embrionarias.
- CTN.** Células troncales neurales.
- DA.** Dopamina.
- DAs.** Dopaminérgicas.
- DAT.** Transportador de dopamina.
- DV.** Dorso-ventral.
- ES.** Células troncales embrionarias.
- FM.** Fascículo medial.
- Fgf8.** Factor de crecimiento fibroblástico 8.
- GFP.** Proteína verde fluorescente.
- LM.** Latero-medial.
- MV.** Mesencéfalo ventral.
- PBS.** Solución salina amortiguada con fosfatos.
- pn.** Postnatal.
- Shh.** Sonic hedgehog.
- SN.** Sustancia nigra.
- SNC.** Sistema nervioso central.
- SNP.** Sistema nervioso periférico.
- SSF.** Solución salina fisiológica.
- TH.** Tirosina Hidroxilasa.
- VL.** Ventrículos laterales.
- VM.** Mesencéfalo ventral.
- VTA.** Área tegmental ventral.



## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es una condición neurodegenerativa causada por la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta, lo que ocasiona una deficiencia de dopamina en el estriado. Como la muerte de estas neuronas es selectiva, se ha pensado que el reestablecimiento de la vía nigro-estriatal, a partir del trasplante de neuronas dopaminérgicas podría ser una terapia para mejorar la sintomatología de la enfermedad. La capacidad de las células troncales embrionarias de autorrenovarse y poderse diferenciar *in vitro* hacia un linaje específico, abre la posibilidad de que pudieran emplearse para terapia celular en la enfermedad de Parkinson, ya que se mantienen indiferenciadas en cultivo por tiempos prolongados y representan una fuente teóricamente ilimitada de neuronas dopaminérgicas; además, sobreviven y se integran al ser trasplantadas en modelos animales.

Estudios en los cuales se ha realizado el trasplante de neuronas dopaminérgicas provenientes del mesencéfalo ventral en ratas adultas lesionadas con 6-hidroxidopamina no muestran una recuperación funcional, debido a que las células trasplantadas son incapaces de extender sus axones y reinervar el estriado. Sin embargo, cuando el mismo tipo de trasplante se realiza en la sustancia nigra de ratas neonatas, se observa crecimiento axonal de la sustancia nigra al estriado lesionado y una recuperación parcial de la función.

El trasplante de neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir de células troncales embrionarias (que son una mejor fuente de neuronas dopaminérgicas que las provenientes del mesencéfalo ventral) no se ha realizado en ratas neonatas; por lo que en este trabajo se estudió la capacidad de las neuronas dopaminérgicas, diferenciadas a partir de células troncales embrionarias, de sobrevivir y de inervar el estriado en ratas neonatas. Se realizaron lesiones bilaterales en ratas de 3 días de edad por medio de la inyección de 6-hidroxidopamina, para ocasionar la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Tres días después de la lesión, las ratas fueron trasplantadas unilateralmente en la sustancia nigra con una suspensión de neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir de células troncales embrionarias. A los 19

días de edad, las ratas lesionadas sin trasplante mostraron un incremento en la actividad motora, a causa de la falta de neuronas dopaminérgicas. Las ratas lesionadas que recibieron el trasplante mostraron una menor actividad que las ratas lesionadas. A los 21 días se realizó la prueba de rotación inducida por apomorfina, en donde se observó que las ratas lesionadas no trasplantadas no giraron, mientras que algunas ratas lesionadas y que recibieron el trasplante mostraron una conducta rotacional (5 giros por minuto). Al día 33 postnatal, las ratas fueron sacrificadas, realizándose una inmunohistoquímica para detectar a la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de dopamina. Se observó una correlación entre el grado de la lesión y la hiperactividad locomotora. El porcentaje de ratas lesionadas fue muy bajo (menor al 30%) y en la mayoría de las ratas no se encontró el trasplante.

Con la finalidad de analizar la sobrevivencia de las neuronas trasplantadas a través del tiempo se realizó un segundo ensayo en donde se sacrificaron a las ratas a diferentes tiempos (6, 14, 21 y 28 días postnatal). Se observó que conforme avanza el tiempo, el número de neuronas del trasplante disminuye, sugiriendo una baja sobrevivencia de las células trasplantadas. En ninguna de las ratas trasplantadas se encontró crecimiento axonal de las células trasplantadas hacia el estriado.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. SISTEMA NERVIOSO

El Sistema Nervioso coordina actividades motoras y cognoscitivas e integra la información que proviene del entorno. Se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC humano regula una serie de funciones como la conciencia, el pensamiento, la percepción, el aprendizaje, la memoria, el lenguaje, el movimiento y muchas otras funciones fisiológicas. El SNC comprende al cerebro y a la médula espinal; está conformado por células especializadas, llamadas neuronas, que están embebidas en una matriz de células que en conjunto se denominan glía. Las neuronas, que continuamente reciben, elaboran, perciben información y toman decisiones, son las unidades anatómicas y funcionales del cerebro que interactúan entre sí para producir la compleja serie de procesos conductuales que se llevan a cabo en un organismo (Stensen, 2000). El cerebro contiene distintos tipos celulares, cada uno con una función diferente y específica. Los diferentes tipos celulares en el cerebro se originan a partir de un sólo tipo celular, las células troncales neurales (CTN; Mujtaba *et al.*, 1999). La generación de gradientes de diferentes moléculas de señalización en el eje dorso-ventral, y las restricciones temporales y espaciales a nivel molecular durante la formación del SNC son eventos fundamentales, para la generación de la diversidad celular existente en el cerebro (Pituello, 1997).

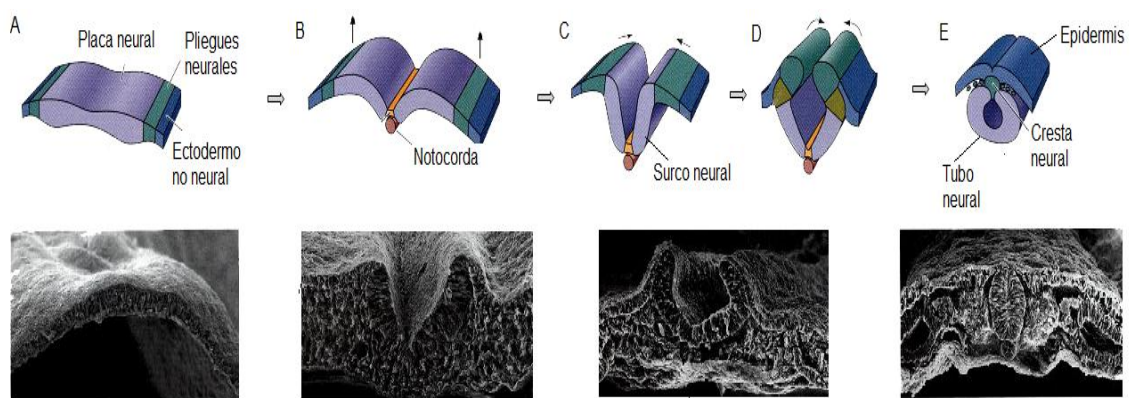
El estudio y entendimiento de cómo se lleva a cabo la regulación de las señales que llevan a la diferenciación celular y a la formación de una citoarquitectura específica durante el desarrollo embrionario, puede llevar al entendimiento de la etiología de diferentes patologías del sistema nervioso, y quizá, en el caso particular de las enfermedades neurodegenerativas (como la Enfermedad de Parkinson) en la que existe muerte selectiva de un tipo neuronal, a la posible reparación del daño, a través del trasplante del tipo neuronal dañado.

Para lograr lo anterior, además de conocer y entender la serie de complejos mecanismos que conducen a la conexión y formación de sinapsis específicas, se necesita comprender los mecanismos que conducen a la diferenciación celular, para así poder obtener una fuente renovable de células capaces de utilizarse en la terapia celular. En este sentido, el estudio de las células troncales (CT) parece ser una de las áreas más prometedoras para los trasplantes, debido a que cuentan con capacidad de auto-renovación y diferenciación.

### 1.1.1. Formación del sistema nervioso central

El SNC se forma a partir de un esbozo embrionario llamado **tubo neural**, el cual se forma a partir del ectodermo neural. El ectodermo es inducido por la notocorda a un proceso de diferenciación en donde las células se elongan provocando el engrosamiento de la parte dorsal del embrión que dan origen a la placa neural. El ectodermo se subdivide en tres regiones: ectodermo no neural, pliegues neurales y placa neural (Fig. 1). Los extremos se denominan ectodermo no neural y dan origen a la epidermis, las partes laterales son los pliegues neurales, que originan las células de la cresta neural y la placa neural es la parte central de la placa, que da origen al tubo neural.

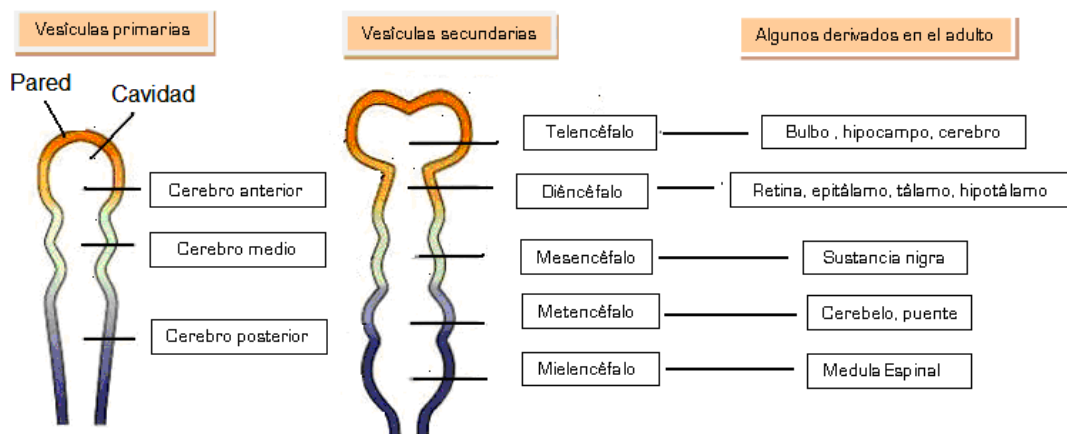
En la neurulación primaria, los pliegues neurales se elevan (Fig. 1B) y los extremos de la placa (ectodermo no neural) se aproximan; la placa neural se encuentra entre los dos pliegues y se deprime formando un surco, denominado surco neural (Fig. 1C).



**Fig. 1. Formación del tubo neural.** A) El ectodermo está formada por tres estructuras: ectodermo no neural, pliegues neurales y placa neural. B) Los pliegues neurales se elevan, formándose una cavidad o surco, llamada surco neural. C) Los pliegues neurales se aproximan cada vez más hacia la línea media, hasta que los extremos de la placa neural (ectodermo no neural) se fusionan (D). E) Se forma la epidermis, a partir del ectodermo no neural, la cresta neural, a partir de los pliegues neurales y el tubo neural a partir de la placa neural (Modificada de Gilbert, 2003).

Los extremos de la placa se aproximan cada vez más hacia la línea media hasta que se fusionan (Fig. 1D), los pliegues neurales descienden para formar la cresta neural y las células de la placa neural se despegan de la epidermis, originando el tubo neural (Fig. 1E; Gilbert, 2003).

Conforme se avanza en el desarrollo embrionario las células del tubo neural se diferencian dando lugar a las diversas estructuras conocidas del SNC adulto. En primera instancia el tubo neural forma tres vesículas primarias: el cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencefalo) y cerebro posterior (romboencefalo). Posteriormente, las vesículas primarias dan lugar a 5 vesículas secundarias: el prosencefalo se subdivide en telencefalo y diencefalo, el cerebro medio no se subdivide y el cerebro posterior origina al metencefalo y mielencefalo. Cada una éstas vesículas origina diversas estructuras del SNC adulto (Gilbert, 2003) como se muestra en la figura 2.



**Fig. 2. Formación de las diferentes estructuras del SNC adulto a partir de las vesículas primarias y secundarias.** Las vesículas primarias están conformadas por el cerebro anterior, medio y posterior a partir de las cuales se forman las vesículas secundarias. El cerebro anterior da origen al telencefalo y diencefalo, el cerebro medio al mesencefalo, que más tarde originará la sustancia nigra y el cerebro posterior al metencefalo y mielencefalo (Modificada de Gilbert, 2003).

Una vesícula de particular interés es el cerebro medio, ya que a partir de éste se origina la sustancia nigra (SN) pars compacta, la cual está formada por neuronas dopaminérgicas, cuya degeneración selectiva es la responsable de los problemas motores observados en la Enfermedad de Parkinson.

### 1.1.2. Formación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Las neuronas dopaminérgicas (DAs) localizadas en el cerebro medio ventral son esenciales para el control de los movimientos y, además, están asociadas con múltiples enfermedades psiquiátricas y degenerativas. Hay tres regiones de neuronas DAs conocidas como regiones A8, A9 y A10 [Carlsson, *et al.*, 1962; Dahlström y Fuxe, 1964; Hökfelt, *et al.*, 1984]. El grupo de neuronas A9 corresponde al núcleo de la SN; estas neuronas están involucradas en el control de los movimientos voluntarios, sintetizan al neurotransmisor dopamina y tienen proyecciones al estriado dorsal (vía nigroestriatal), sitio donde liberan la dopamina [Dianne, *et al.*, 2008; Fig. 3].

El desarrollo de las neuronas DAs incluye eventos de desarrollo temprano como la especificación, la diferenciación y la migración, así como, eventos tardíos, como el crecimiento neurítico, la arborización y la formación de conexiones sinápticas [Dianne, *et al.*, 2008].

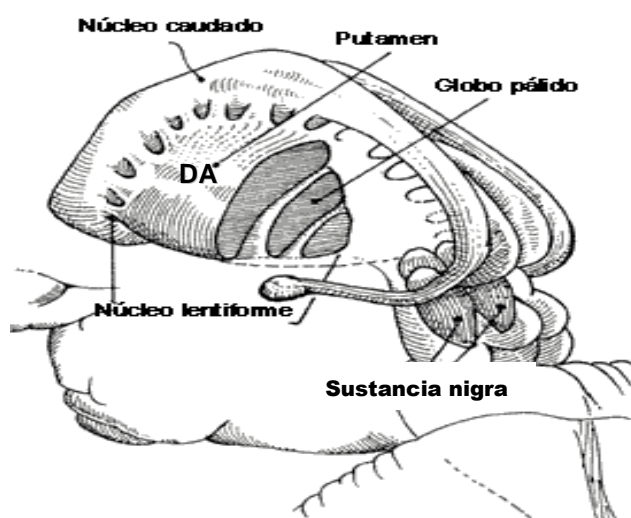
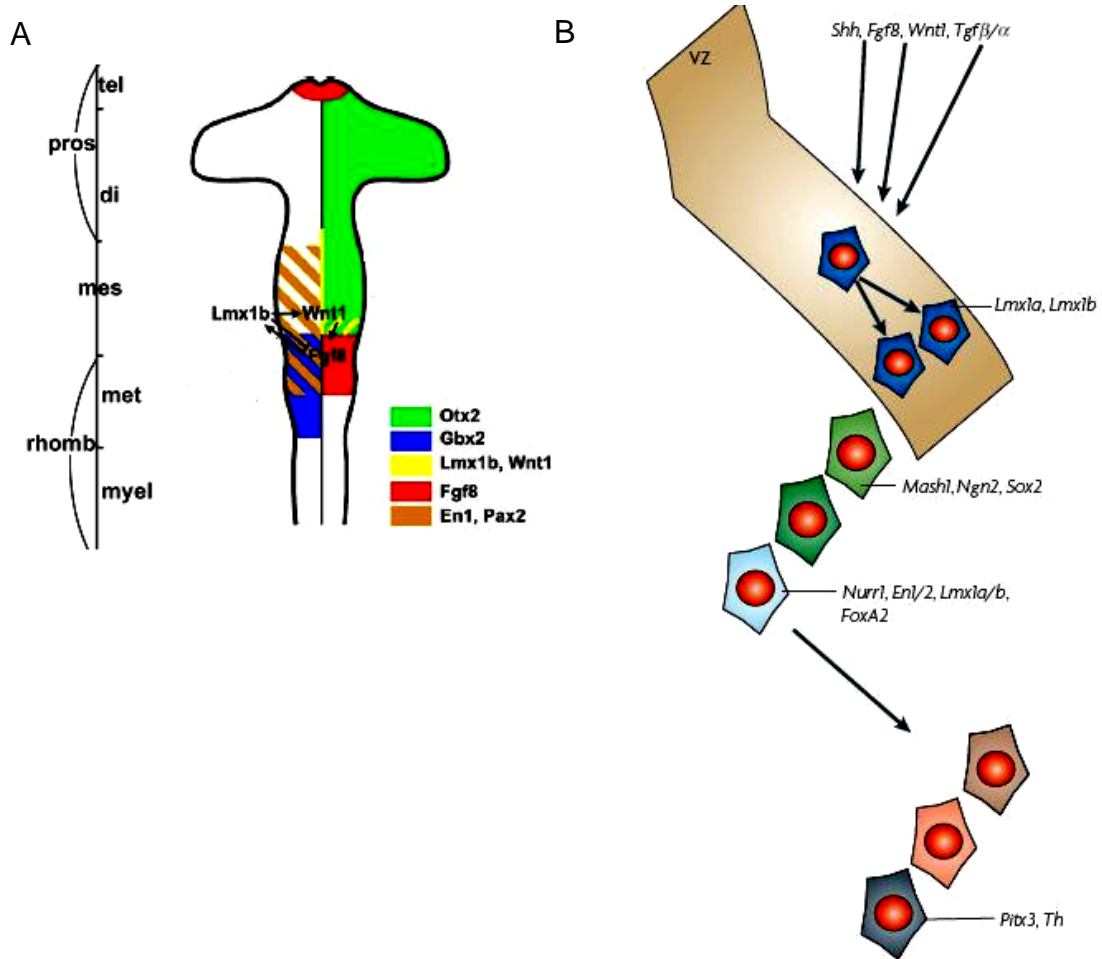


Fig. 3. Vía nigro-estriatal de cerebro humano. La sustancia nigra es el sitio donde se encuentran los somas de las neuronas dopaminérgicas, que proyectan sus axones hacia el estriado, formado por el núcleo caudado y el putamen, sitio donde se libera la dopamina [DA].

#### 1.1.2.1. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas

La generación de neuronas DAs se da en una región específica del mesencéfalo en desarrollo. Para que sea posible, es fundamental que primero se lleve a cabo la especificación de una zona permisiva para la generación, diferenciación y crecimiento de estas neuronas; esta zona está definida por la expresión de genes específicos en la zona ventricular del mesencéfalo. Estas señales son las que inducen a las células

mitóticas en esta región a que se conviertan en neuronas jóvenes postmitóticas las que están destinadas a convertirse en neuronas DAs maduras (Smidt y Burbach, 2007).



**Fig. 4. Moléculas involucradas en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. A)** Factores de transcripción indispensables para la formación de la zona permisiva para la formación y diferenciación de neuronas dopaminérgicas. La expresión de *Otx 2*, *Pax 2* y *En1* define la formación del mesencéfalo. El borde entre el diencefalo y el mesencéfalo está determinado por interacciones represivas entre *Pax6*, *En1/Pax 2*. El borde entre el mesencéfalo y el metencéfalo se forma a través de interacciones represivas entre *Otx2* y *Gbx2*. *En 1*, *Pax2*, *Wnt* y otros factores desconocidos inducen la expresión de *Fgf8*. La expresión de *Wnt* es inducida por *Lmx1b*. **B)** Señales moleculares necesarias para la formación de neuronas dopaminérgicas mesodiencefálicas. *Shh*, *FGF8*, *Wnt 1/5a*, factor de crecimiento transformante  $\beta/\alpha$  [*Tgf  $\beta/\alpha$* ] son señales de inducción temprana. La inducción tardía incluye a moléculas como achaete-schute homólogo 1 [*Mash 1*], neurogenina 2 [*Ngn2*] y *Sox 2*. Cuando se deja de expresar *Ngn2*, se induce la expresión de *Nurr1* y de *En1 y 2*. Finalmente, para que las células tengan un fenotipo dopaminérgico es necesaria la expresión del gen *Pitx3*. Prosencéfalo [Pros], telencefalo [Tel], diencefalo [di], mesencéfalo [mes], metencéfalo [met], myel [mielencéfalo], rombencéfalo [rhomb]. [Modificada de Dianne, *et al.*, 2008 y Nakamura y Watanabe, 2005].

Uno de los eventos cruciales para la especificación de las neuronas DAs es la formación del istmo, que es el borde que existe entre el cerebro medio y el cerebro posterior. En el istmo se sintetiza el factor de crecimiento fibroblástico 8 (Fgf8), que junto con la proteína morfogénica sonic hedgehog (Shh) que es sintetizada y secretada por la notocorda y la placa del piso permiten la inducción de las neuronas DAs. Dentro de las señales tempranas cruciales para el establecimiento del cerebro medio y del cerebro posterior están las señales del factor de transcripción Wnt, cuya expresión es inducida por la de otro factor de transcripción llamado Lmx1b, que activa a los genes engrailed (En), necesarios para el desarrollo de las neuronas DAs en estados más tardíos (Fig. 4A; Smidt y Burbach, 2007; Nakamura y Watanabe, 2005).

Una vez que se ha regionalizado la zona permisiva, empiezan a aparecer otro tipo de señales que conducen al desarrollo y diferenciación de las neuronas DAs (Fig. 4B). Estas señales moleculares influyen el destino de las neuronas nacientes de una posición ventral y dorsal específicas a lo largo del eje mesodiencefálico e inducen los pasos esenciales de la diferenciación hacia el fenotipo neuronal dopaminérgico (Fig. 4B; Smits, *et al.*, 2006; Puellas y Rubenstein, 1993; Vernay, *et al.*, 2005).

#### ***1.1.2.2. Crecimiento neurítico y arborización de las neuronas dopaminérgicas***

En la rata, las primeras neuronas DAs aparecen en el día embrionario (E) 12 y las primeras prolongaciones neuríticas se observan en E13. El crecimiento de los axones sigue en primera instancia una trayectoria dorsal en el cerebro medio, pero después cambia su dirección hacia el cerebro anterior. Debido a esta reorientación, los axones dopaminérgicos toman un curso ventro rostral hacia el diencéfalo a través del telencéfalo en E14 (Gates, *et al.*, 2004; Nakamura y Watanabe, 2005). Una vez que los axones salen del cerebro medio, se bifurcan en dos direcciones (E17), formando lo que se conoce como fascículo medial (FM). Los axones del FM se dirigen hacia la parte ventrolateral del telencéfalo y se proyectan hacia distintas regiones del cerebro anterior, entre ellas el estriado y la corteza cerebral (E19; Fig. 5).



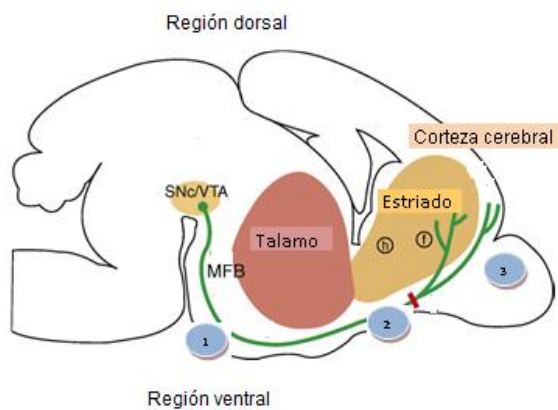


Fig. 5. Trayectoria que siguen los axones dopaminérgicos provenientes de la sustancia nigra pars compacta (SNc) y el área tegmental ventral (VTA) en el cerebro de rata. Los axones que se originan en la SNc y el VTA siguen primero una trayectoria dorsal. Posteriormente en el día E14 cambian su dirección hacia el cerebro anterior, siguiendo una trayectoria ventrorostral (2). Más tarde los axones bifurcan (E17) dirigiéndose, los provenientes de la SN, hacia el estriado y, los provenientes del VTA, a la corteza cerebral (3), lo cual sucede al día E19. MFB indica el fascículo medial (Modificada de Gates, *et al.*, 2004).

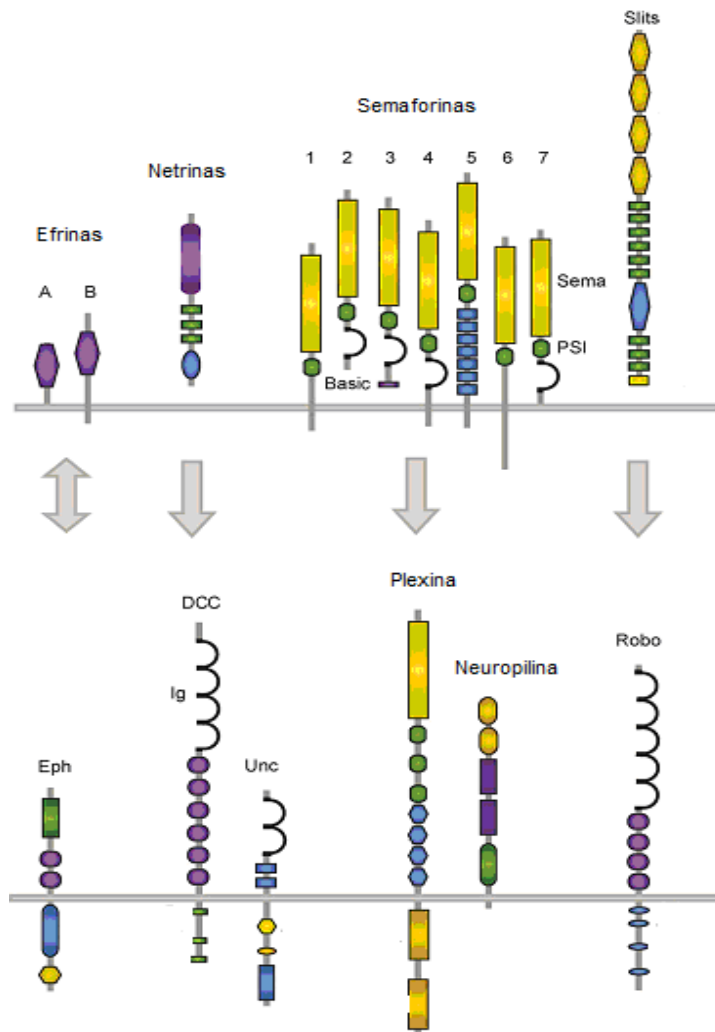
El crecimiento axonal hacia el estriado continúa en la primera semana después del nacimiento. Los axones crecen invadiendo al estriado en la región cercana a los ventrículos laterales (VL). A partir de la primera semana después del nacimiento y hasta la semana tres posnatal (pn), el estriado sigue presentando modificaciones.

Los parches, estructura característica del estriado, van desapareciendo conforme se avanza en el tiempo del desarrollo, hacia la tercera semana después del nacimiento, los parches son reemplazados casi por completo por un tipo de innervación difusa en el estriado. Los parches desaparecen en el estriado ventral conservándose algunos en estriado dorsal y dorsolateral (Dianne, *et al.*, 2008).

Todos estos eventos que ocurren en el desarrollo de la vía nigro-estriatal están regulados por diferentes moléculas que guían a los axones hacia su blanco específico una vez que los axones llegan a su blanco es indispensable que puedan establecer conexiones sinápticas funcionales (Dianne, *et al.*, 2008). El crecimiento de los axones que van desde la SN hasta el estriado siguen un camino específico (Fig. 5), en dicho camino deben existir señales tanto de atracción, que guíen a los axones hacia su blanco específico; como de repulsión, que impidan que los axones entren a zonas no adecuadas. Las moléculas involucradas en estos eventos pueden tener una acción a corto alcance (asociadas a membrana) o a largo alcance (moléculas solubles). Las moléculas guías involucradas en el crecimiento axonal son los complejos ligando-receptor netrina-DCC, Robo-Slit y semaforina-plexina-neuropilina (Fig. 6; Dianne, *et al.*, 2008; Smidt y Burbach, 2007). Robo es el receptor de Slit. Robo1 se localiza en la

SN y en el área tegmental ventral (VTA) y Robo2 se encuentra exclusivamente en la SN. Slit1, 2 y 3 tienen una acción repelente sobre los axones dopaminérgicos. Durante el desarrollo, Robo2 está expresado en la parte ventral del cerebro medio. Slit3 está expresado en el cerebro medio caudal y está posiblemente involucrado en las acciones repulsivas que inician el cambio de dirección de las fibras que expresan Robo hacia la parte rostral del cerebro. El cerebro medio dorsal expresa Slit1 al día E15, que después del crecimiento dorsal de los axones dopaminérgicos crecen hacia la dirección rostro-ventral (Dianne, *et al.*, 2008).

El estudio de las señales de inducción dopaminérgica y de guía axonal podría ser de gran ayuda para la terapia celular en la enfermedad de Parkinson. La inducción dopaminérgica podría llevar a la generación *in vitro* de neuronas DAs para ser trasplantadas. Una vez trasplantadas las neuronas deben extender sus axones en forma dirigida para poder establecer conexiones sinápticas con las células blanco específico.



**Fig. 6. Moléculas guías de axones.** Se muestra los diferentes tipos de moléculas guía [parte superior] con sus receptores conocidos [parte inferior]. Se conocen dos tipos de efrinas (clase A y clase B) con un solo receptor Eph. Las netrin son proteínas secretadas y se conocen dos tipos de receptores (DCC y Unc). Existen 7 isoformas de las semaforinas, cuyo receptor es la plexina que puede actuar junto con la neuropilina. El receptor de la molécula soluble Slit es Robo. (Modificada de Dianne, *et al.*; 2008).

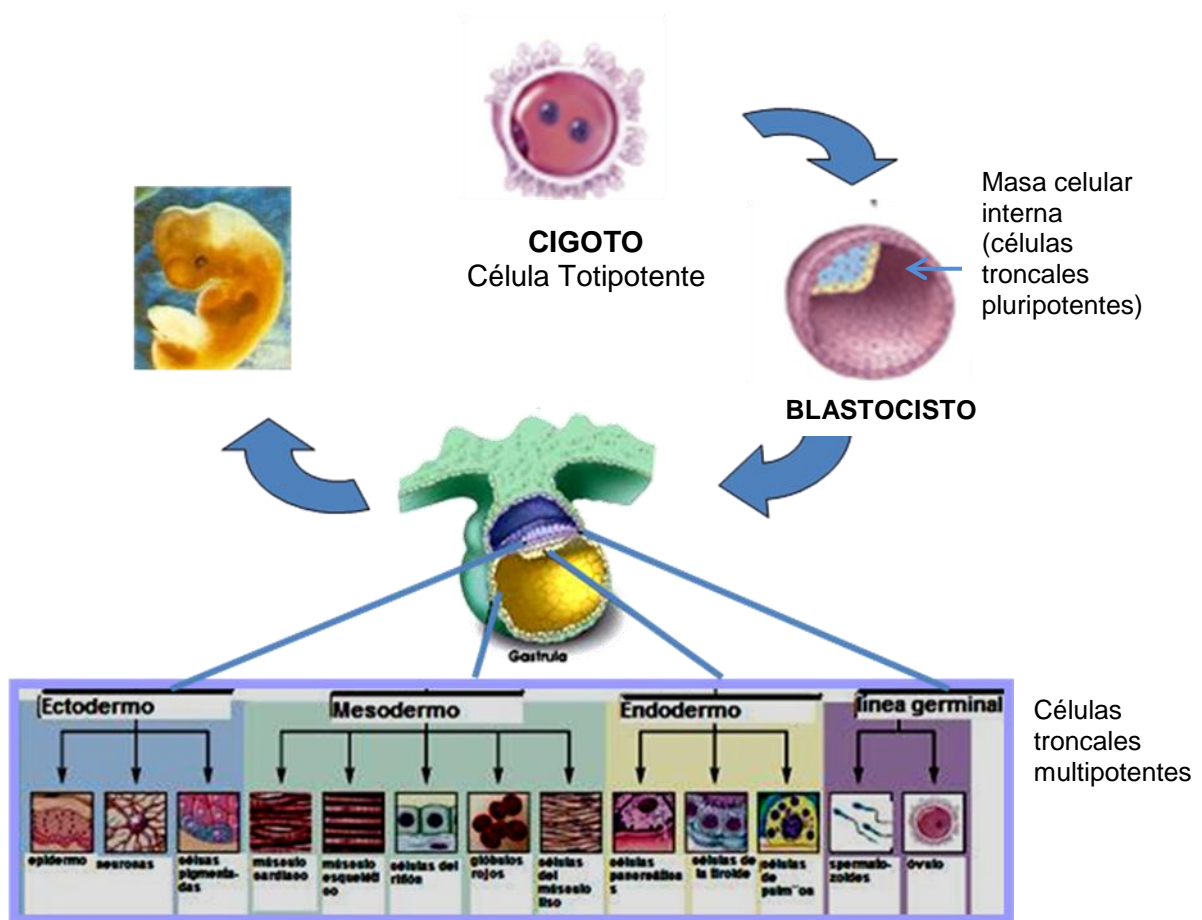
## 1.2. CÉLULAS TRONCALES

Las CT son células que tienen la capacidad de autorrenovarse en un estado indiferenciado y la posibilidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares maduros, por lo que juegan un papel importante en la organogénesis, durante el desarrollo embrionario y en la regeneración de tejidos (Donovan y Gearhart, 2001). Debido a las características de estas células, se ha pensado en el uso potencial que pudieran tener en el tratamiento de enfermedades, en las cuales las células de algún órgano o tejido se han perdido o sufrido algún daño, como ocurre en la diabetes *mellitus*, en infartos al miocardio, en leucemias o en enfermedades neurodegenerativas. Es posible que tras este tipo de terapia pudieran disminuirse, en cierto grado, los síntomas de estas enfermedades y restaurarse de manera parcial la función perdida. En el caso particular de los enfermos con Parkinson (en donde se presenta muerte selectiva de las neuronas DAs) ya se han realizado trasplantes de neuronas DAs, provenientes de fetos humanos. Los resultados que se obtuvieron no fueron del todo satisfactorios, por lo que la búsqueda de nuevas fuentes de neuronas DAs y de métodos de trasplante no ha cesado. En este sentido, las células DAs, diferenciadas *in vitro* a partir de células troncales, podrían ser una fuente importante de neuronas, las que pudieran emplearse como terapia de reemplazo celular en la Enfermedad de Parkinson (Lindvall y Björklund, 2004; Svendsen y Langston, 2004).

### 1.2.1. Tipo de células troncales

A partir de la fusión de un óvulo y un espermatozoide se forma el cigoto, en el cual, inmediatamente, comienza el proceso de división y, posteriormente, el de diferenciación, produciendo un organismo maduro completo. El cigoto se conoce como una **célula totipotente**, lo cual quiere decir que tiene la capacidad de diferenciarse y dar lugar a cualquier tipo celular, incluyendo tejido extraembrionario como el trofoblasto (Carlson, 2000).

En roedores, cuatro días posteriores a la fecundación se forma el blastocisto. El blastocisto es una estructura de aproximadamente 120 células que está formada por una capa externa, una masa celular interna y una cavidad interior. La capa externa forma la placenta y las estructuras extraembrionarias; la masa celular puede dar lugar a cualquiera de los diferentes tipos celulares conocidos de un individuo adulto (Fig. 7; Carlson, 2000).

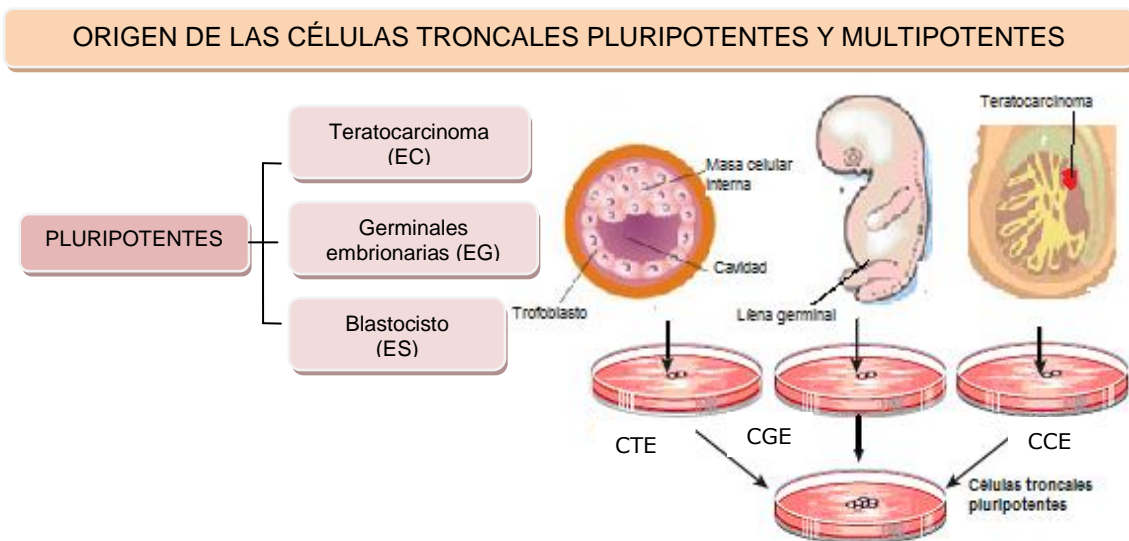


**Fig. 7. Diferenciación de los diversos tejidos.** El cigoto tiene la capacidad de diferenciarse y dar origen a todas las células de un individuo adulto incluyendo las capas extraembrionarias, por lo que se considera totipotente. Células pluripotentes son consideradas las células de la masa celular interna del blastocisto que pueden diferenciarse en cualquier tipo celular de las tres capas germinales. Multipotentes son las células que sólo pueden dar origen a células dentro de un tejido.

Las células de la masa celular interna del blastocisto, ya no se consideran totipotentes ya que una vez removidas del blastocisto, son incapaces de dar origen a un individuo completo (Fig. 7; Donovan, 2001). Son consideradas **células pluripotentes** aquellas que pueden dar origen a cualquiera órgano o tejido proveniente de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo (Chambers y Smith, 2004, Thomson, *et al.*, 1998). No sólo se pueden encontrar células pluripotentes en el blastocisto; también pueden encontrarse células pluripotentes en tejido fetal que ha sido destinado a ser parte de las gónadas

[células primordiales germinales] y en teratocarcinomas gonadales desarrollados en el adulto. Las células troncales pluripotentes aisladas del blastocisto se conocen como **células troncales embrionarias (CTE)**, las aisladas del tejido fetal se conocen como **células germinales embrionarias (CGE)** y las aisladas de teratocarcinomas testiculares se conocen como **células de carcinoma embrionario (CCE)**; (Fig. 8; Donovan, 2001).

Conforme se avanza en el desarrollo embrionario, ocurre la gastrulación y las células se van dirigiendo hacia un linaje específico, siendo las células en etapas más tardías del desarrollo **multipotentes**. Se consideran células troncales multipotentes a aquellas células que dan origen a precursores o progenitores celulares, y que, posteriormente, se diferencian en tipos celulares específicos, maduros y con funciones especializadas dentro de un tejido (Fig 7; Kirschstein y Skirboll, 2001). Tales linajes se pueden encontrar en tejido embrionario y en el tejido adulto. Las células troncales multipotentes presentes en el adulto se conocen con el nombre de **células troncales adultas**.



**Fig. 8.** Origen de células troncales pluripotentes humanas. Las células troncales pluripotentes, que se derivan de la masa celular interna, se conocen como células troncales embrionarias (CTE), las que se derivan de la línea germinal, son células germinales embrionarias (CGE) y las que se derivan de tumores testiculares de adulto, son células de carcinoma embrionario (CCE). Cada uno de los tres tipos de células pluripotentes se mantienen en cultivo, sobre una capa de células alimentadoras fibroblásticas (Modificada de Donovan, 2001).

Las **células troncales adultas** son células no diferenciadas que se encuentran inmersas en un tejido diferenciado y especializado, que son capaces de renovarse y de diferenciarse en los tipos celulares del tejido del cual se originan. Estas células residen en un ambiente especial llamado “nicho” el cual varía en localización y naturaleza dependiendo del tipo de tejido del cual provenga. Su función es llevar a cabo la regeneración del tejido, reemplazando la pérdida celular debida a la muerte celular natural (Kirschstein y Skirboll, 2001).

Dentro de las CT multipotentes se han aislado CTN del cerebro medio en desarrollo y se ha logrado la diferenciación de estas células a neuronas DAs, aunque en eficiencia muy baja (Studer, *et al.*, 1998). Las CTE pueden generar una mayor proporción de neuronas que secretan DA *in vitro* (Kawasaki, *et al.*, 2000; Perrier, *et al.*, 2004). Neuronas DAs derivadas de CTE se han trasplantado en animales parkinsonianos adultos y se ha observado una recuperación conductual consistente, al realizar los injertos en el estriado (Bjorklund, *et al.*, 2002, Kim, *et al.*, 2002; Rodriguez-Gómez, *et al.*, 2007; Hedlund, *et al.*, 2008).

## II. ANTECEDENTES

Si bien es cierto que se debe asegurar que las células DAs crecidas en cultivo sobrevivan al ser trasplantadas y sean eficientes en la liberación de dopamina, igualmente importante es que se establezcan los contactos sinápticos con el sitio blanco. Los trasplantes de neuronas DAs en cerebro receptor. En animales adultos, las neuronas DAs se trasplantan en el estriado porque el implante de neuronas DAs en la SN de animales adultos no provee de dopamina al estriado y, por lo tanto, los animales no se recuperan por completo. La recuperación de la vía anatómica nigro-estriatal depende, más que de la sobrevivencia de las células en la SN o de la liberación de la dopamina en el estriado, de la capacidad de las células trasplantadas de extender axones hacia el estriado al ser implantadas en esta región.

Se ha observado que, en el cerebro adulto de ratas parkinsonianas trasplantadas con neuronas DAs provenientes del mesencéfalo ventral (VM) de fetos, los injertos son incapaces de reinervar el estriado, aún cuando son colocadas muy cerca de la estructura blanco denervada [Björklund, *et al.*, 1983; Nikkah, *et al.*, 1994a; Nikkah, *et al.*, 1994b]. La presencia de factores inhibitorios del crecimiento axonal a lo largo del camino nigro-estriatal y la ausencia de un adecuado sustrato que guíe el crecimiento pueden explicar la imposibilidad de los axones de las neuronas DAs, trasplantadas en la SN, de reinervar el estriado [Schnell y Schwab 1990; Schwab 1990, 1993].

Sin embargo, se observa un fenómeno diferente si se trasplantan neuronas DAs fetales del MV en la SN de ratas neonatas previamente lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). La 6-OHDA es un análogo de la dopamina y es introducido a las neuronas DAs por medio del transportador de dopamina (DAT). En estos estudios, se ha visto que los axones de las células trasplantadas en la SN son capaces de establecer conexiones con el estriado denervado [Nikkah, *et al.*, 1995a]. Estos animales muestran una recuperación parcial de la función motora porque las células trasplantadas provienen del MV de fetos de rata del E14 y las ratas que reciben el trasplante se encuentra en una etapa del desarrollo diferente (día 3 pn). La recuperación parcial observada también es causa de que la lesión se realiza bilateralmente y el trasplante solamente unilateral [Nikkah, *et al.*, 1995b].

En el trabajo de Nikkhah, *et al.*, [1995] se trasplantaron neuronas DAs provenientes del mesencéfalo ventral de ratas del día embrionario E14, en nuestro trabajo se quiere probar la capacidad de las neuronas DAs provenientes de células ES de inervar el estriado. Al ser el cerebro neonato un medio permisivo para el crecimiento axonal se piensa que al realizar el trasplante de células DAs diferenciadas de células ES en la SN de ratas neonatas, los axones de las neuronas DAs trasplantadas serán capaces de crecer sus axones e inervar al estriado.



## **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1. HIPÓTESIS**

Si el cerebro de ratas neonatas tiene condiciones permisivas para el crecimiento axonal, entonces al implantar neuronas dopaminérgicas diferenciadas de células troncales embrionarias en la sustancia nigra en ratas neonatas, estas neuronas podrán extender sus axones e inervar el estriado.

### **3.2. OBJETIVOS**

#### **3.2.1. Objetivo general**

Establecer si el implante en la sustancia nigra de neuronas dopaminérgicas provenientes de células troncales embrionarias pueden extender axones de manera dirigida al estriado en ratas de 6 días pn.

#### **3.2.2. Objetivos particulares**

1. Búsqueda de coordenadas para lesión con 6-OHDA en ventrículos en ratas de 3 días pn y para el trasplante en SN en ratas de 6 días pn.
2. Estandarizar la lesión con 6-OHDA en ratas de 3 días de nacidas.
3. Trasplantar células DAs provenientes de células ES, en ratas de 6 días previamente lesionadas con 6-OHDA.
4. Establecer si las células DAs trasplantadas en la SN sobreviven y pueden reinervar el estriado.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

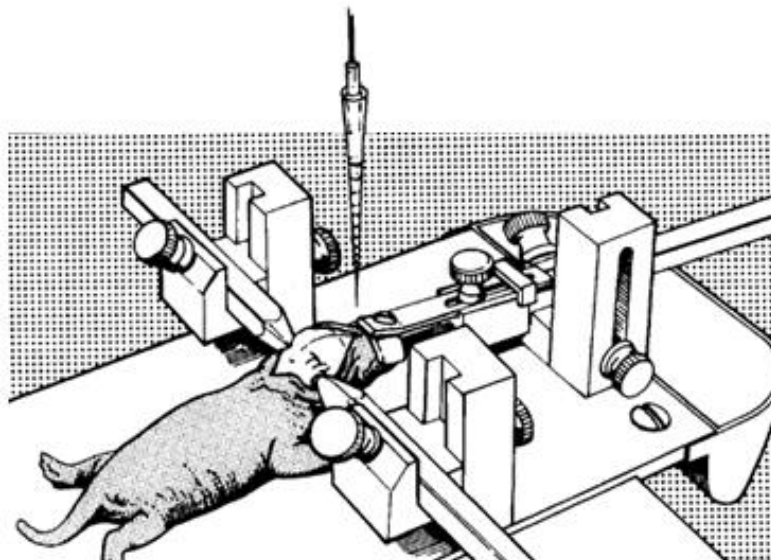
### 4.1. ANIMALES

Se obtuvieron ratas hembras de la cepa Wistar con fetos de 19 días de gestación. Las ratas se colocaron individualmente en un cuarto mantenido a una temperatura de 23°C con ciclos de luz oscuridad de 12 horas, con acceso libre de agua y alimento. Una vez nacidas las crías, se mantuvieron con la madre en el mismo cuarto y bajo las mismas condiciones. Al día 3 y 6 pn, la madre fue separada de sus crías y colocada en una jaula diferente, las crías se mantuvieron en la cama original para ser operadas por medio de cirugía estereotáxica. Al finalizar la operación de la camada completa, la madre se regresó a la caja donde se encontraban las crías.

### 4.2. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

La cirugía estereotáxica permite intervenir quirúrgicamente en zonas específicas del cerebro. El aparato estereotáxico consta de un mecanismo calibrado para poder desplazar el dispositivo en tres ejes: antero-posterior (AP), dorso-ventral (DV) y latero-medial (LM).

El aparato consta de una aguja que se mueve en las tres coordenadas antes mencionadas y una estructura para sujetar la cabeza de la rata de manera firme (Fig. 9).



**Fig. 9. Aparato estereotáxico.** Se muestra el adaptador para ratas neonatas. La cabeza de la rata se coloca de manera firme con la ayuda de unos lápices [Tomada de Cunningham y McKay, 1993].

Las coordenadas se establecen con la ayuda de un atlas que señala las diferentes zonas del cerebro en coordenadas específicas. Las coordenadas pueden variar dependiendo de la cepa y de la edad del animal por lo que es importante siempre realizar los ensayos necesarios para corroborarlas.

El animal debe estar fijo y correctamente colocado en el estereotáxico, ya que cualquier localización errónea conllevará a llegar a una zona del cerebro incorrecta. Una vez que se ha fijado la cabeza del animal, se procede a realizar una incisión para dejar descubierto el cráneo. La cánula o aguja se puede situar en dos incisiones (lambda y bregma; Fig. 10) que sirve como punto de partida para poder moverse de acuerdo a las coordenadas deseadas.

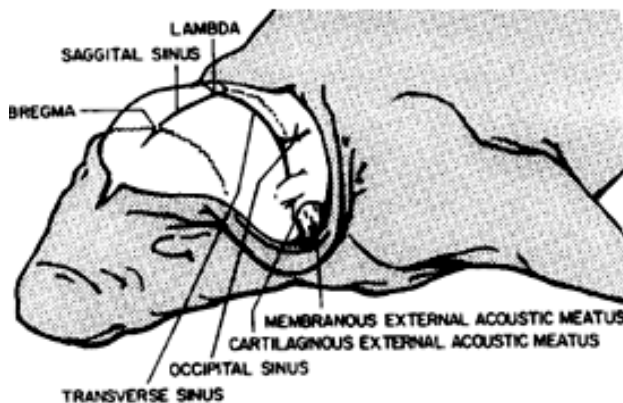


Fig. 10. Preparación del animal antes de la cirugía estereotáxica. Se puede observar las dos suturas craneales: bregma y lambda. [Tomada de Cunningham y McKay, 1993].

#### 4.3. BÚSQUEDA DE COORDENADAS PARA LA INYECCIÓN EN LOS VENTRÍCULOS LATERALES, FASCÍCULO MEDIAL Y SUSTANCIA NIGRA

Se desea provocar la muerte de las neuronas DAs. La manera en que se logra la muerte de dichas neuronas es inyectando 6-OHDA en los VL o en el FM. Se realizará la inyección de 6-OHDA en los VL o en el FM de ratas de 3 días pn para provocar la muerte de las neuronas DAs. Posteriormente se trasplantaran neuronas DAs diferenciadas a partir de CTE en la SN de ratas de 6 días pn.

Como se mencionó anteriormente, es necesario realizar ensayos para asegurar que por medio de la cirugía estereotáxica se llegue a la región deseada (en este caso VL, FM y SN). Dichos ensayos se realizan inyectando colorante en la región de interés,

posteriormente se realizan cortes histológicos y por medio de microscopía en campo claro se observa si el colorante cayó en la región del cerebro deseada, sino es así, se prueban más coordenadas hasta lograrlo.

Las coordenadas para lograr la inyección en VL de ratas de 3 días pn se desconocen. Lo que se conoce son las coordenadas para lograr el depósito en VL de ratas de 0 días pn [Nikkah, *et al.*, 1994a]. Se probó si las coordenadas reportadas para ratas de 0 días pn podían emplearse para ratas de 3 días pn, por lo que se inyectó colorante en la rata de 3 días pn, siguiendo las siguientes coordenadas: AP = -0.6, LM =  $\pm 0.8$  y DV = -2.0.

Las coordenadas reportadas para inyectar en FM en ratas de 3 días pn son las siguientes: AP = -0.6, LM =  $\pm 1.1$  y DV = -5.8 [Mennicken, *et al.*, 1995; Abrous, *et al.*, 1990]. Sin embargo se realizaron las siguientes pruebas para ajustarlas: 1) AP = -0.6, LM =  $\pm 1.1$  y DV = -5.3. 2) AP = -0.6, LM =  $\pm 1.1$  y DV = -5.0. 3) AP = -0.6, LM =  $\pm 1.1$  y DV = -4.8.

Las coordenadas que se ensayaron para sustancia nigra fueron: 1) AP=-3.7, LM =  $\pm 1.6$  y DV=-4.3. 2) AP=-4.2, LM =  $\pm 1.6$  y DV=-4.3. 3) AP=-4.2, LM =  $\pm 1.7$  y DV=-4.3. 4) AP=-4.2 LM =  $\pm 1.8$  y DV=-4.3. 5) AP=-4.2, LM =  $\pm 1.9$  y DV=-4.3. 6) AP=-4.2, LM =  $\pm 2.0$  y DV=-4.3. 7) AP=-4.2, LM =  $\pm 2.1$  y DV=-4.3. 8) AP=-4.2, LM =  $\pm 1.9$  y DV=-4.4. 9) AP=-4.2, LM =  $\pm 1.9$  y DV=-4.6.

#### **4.4. INYECCIÓN DE COLORANTE POR CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA**

La inyección de colorante se realizó por medio de cirugía estereotáxica, para lo cual las ratas se anestesiaron con halotano (inducción 2%, mantenimiento 1%) y se colocaron cuidadosamente en el estereotáxico con un adaptador para neonatos (Fig. 9), teniendo especial cuidado en la correcta colocación de la cabeza, lo cual es indispensable para un depósito exacto en la región de interés. Posteriormente, se limpió la zona de incisión con una solución de iodopovidona al 10%. Después, se realizó una incisión en la parte media del cráneo y se localizó bregma. Una vez localizada bregma, se fijaron las coordenadas y se realizó la inyección bilateral de azul de metileno al 10%. En ratas de 3 días de edad se inyectaron 5  $\mu$ L en los VL y 0.2  $\mu$ L en el FM. En ratas de 6 días de edad se inyectó 1  $\mu$ L en la SN. Una vez efectuado el

depósito del colorante, el cerebro fue extraído, colocado en una solución de formalina al 10 % y conservado a 4°C.

#### **4.5. PROCESAMIENTO DEL CEREBRO**

Se realizaron cortes sagitales de 50  $\mu\text{m}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  con la ayuda de un criostato. Los cerebros se obtuvieron en laminillas previamente gelatinizadas. Las laminillas se cubrieron con una solución de gelatina al 1% y se dejaron secar 48 horas a temperatura ambiente. Los cortes fueron analizados por medio de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) y las imágenes fueron adquiridas por medio de una cámara fotográfica digital adaptada al microscopio (Nikon CoolPix S10).

En algunos casos el sitio de la inyección se observó mejor en el cerebro montado en el criostato que en la laminilla, por lo que algunas imágenes se capturaron directamente del cerebro montado en el criostato.

#### **4.6. ESTANDARIZACIÓN DE LA LESIÓN CON 6-OHDA**

##### **4.6.1. Inyección de 6-OHDA en ventrículos laterales**

Para la estandarización de la lesión con 6-OHDA en ratas de 3 días de nacidas, se emplearon un total de 66 ratas. Los animales se dividieron en tres grupos. Un grupo de ratas intactas (36 animales), un grupo control que se inyectó con solución salina fisiológica (SSF) con ácido ascórbico al 0.1% (vehículo, 35 animales) y un grupo inyectado con 6-OHDA en los VL (44 animales). Para este último grupo, se administraron bilateralmente, y por medio de cirugía estereotáxica 55  $\mu\text{g}$  (calculado como base libre) de 6-OHDA-HCl (Sigma-Aldrich) en 5  $\mu\text{L}$  de la solución vehículo. El grupo control fue inyectado bilateralmente con el mismo volumen. El grupo de ratas intactas no fue inyectado. Las coordenadas que se emplearon fueron las confirmadas con la inyección con colorante: AP=  $-0.6$ ; LM =  $\pm 0.8$ , DV =  $-2.1$  respecto a bregma.

##### **4.6.2. Inyección de 6-OHDA en fascículo medial**

Los animales se dividieron en dos grupos. Un grupo control (11 animales) y un grupo inyectado con 6-OHDA en FM (5 animales). Como esta inyección se dirige directamente al haz de axones dopaminérgicos, se administraron bilateralmente por medio de cirugía estereotáxica una menor cantidad de 6-OHDA: 8  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA-HCl

en 0.2  $\mu$ L de una solución de vehículo. El grupo control fue inyectado con el mismo volumen. Las coordenadas que se emplearon fueron las confirmadas por la inyección con colorante (AP = -0.6; LM =  $\pm$  1.1; DV = -4.8 respecto a bregma).

Posterior a la cirugía, las ratas fueron regresadas a la madre y se monitoreó que no fueran rechazadas por ella.

#### **4.6.3. Evaluación de la actividad motora**

Con la finalidad de evaluar el grado de lesión a causa de la inyección de 6-OHDA, se realizó una prueba de actividad locomotora en campo abierto cuando los animales tuvieron 19 días de edad. La prueba se realizó por medio de sistema cuantificador de la actividad (VersaMax Animal Activity Monitoring System; Aucascam Instruments), que se encuentra conectado a una computadora. El equipo cuenta con dos emisores de rayos infrarrojos, colocados, uno a nivel del piso para el registro de los movimientos horizontales y otra a 10 cm del piso para el registro de los movimientos verticales. El equipo cuenta con cajas de plástico con una dimensión de 10 cm de largo y ancho, con una altura de 20 cm. Para la realización de la prueba, el animal se separa de la madre, se coloca en el ambiente nuevo y, posteriormente, se monitorea su actividad por 30 minutos. Cada vez que la rata se mueve, el haz de luz es interrumpido, lo cual es registrado por la computadora y acumulado cada 5 minutos.

Los animales tratados con 6-OHDA que sufrieron muerte de las neuronas DAs y que por lo tanto tienen un estriado deficiente de DA muestran a esta edad una mayor actividad que los animales control. Por medio de esta prueba, se ha comprobado que animales con denervación dopaminérgica, causada por la lesión con 6-OHDA, muestran un aumento en la actividad motora. La diferencia en la actividad entre el grupo control y el lesionado es estadísticamente significativa a los 19 días pn (Shaywitz, *et al.*, 1976). Por lo que al día 19 pn, se midió la actividad motora de los animales que no fueron inyectados (grupo intacto), de los animales inyectados con el vehículo (grupo control) y de los animales inyectados con 6-OHDA (grupo lesionado).

Al día 33 pn, los animales fueron sacrificados y el cerebro extraído, para lo cual los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (100 mg/kg de peso; Pet's Pharma de México S.A de C.V). Posteriormente, las ratas fueron

perfundidas con 200 mL de solución salina a 37°C, posteriormente, fijadas con 200 mL de paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH = 7.4 y conservados a 4° C. Los animales fueron decapitados, el cerebro extraído y éste fue conservado en paraformaldehído al 4%. A las 24 horas, los cerebros fueron lavados con PBS y cambiados a una solución de sacarosa al 10%, después de 24 horas de permanecer en esta solución se cambiaron a una solución de sacarosa al 20% y 24 horas posteriores a una solución de sacarosa al 30 %. Con la ayuda de un criostato se obtuvieron cortes coronales en flotación de 50 µm de grosor.

#### **4.6.4. Inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa**

Al día 33 pn se realizó un ensayo inmunohistoquímico, por medio del cual se pudo observar el grado de lesión. Para realizar la inmunodetección de tirosina hidroxilasa (TH), los cortes se incubaron con una solución que contenía suero normal de cabra (Gibco, Invitrogen) al 10% y tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.3% disueltas en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se enjuagaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH; Sigma-Aldrich) hecho en ratón a una dilución 1:1000 en una solución de PBS-suero de cabra al 0.1% por 48 horas a temperatura ambiente. Al término de este periodo de incubación, los cortes se incubaron con solución de lavado (PBS-albúmina 0.1%) y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (dilución 1:1000 en PBS-suero de cabra al 1%) acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) durante 4 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Los cortes se lavaron con PBS y se agregó Hoechst 33258 (1 ng/ml; Sigma) por 5 minutos, se lavaron con PBS y se colocaron los cortes en lamillas. Posteriormente, se montaron con medio de montaje (Aqua Poly/Mount; Polysciences, Inc) a oscuras. Los cubreobjetos se sellaron con barniz de uñas.

La extensión del daño fue analizada cualitativamente por medio de la inmunodetección de la enzima TH, (enzima limitante de la síntesis de catecolaminas). Posteriormente, se realizó una correlación entre el grado de denervación dopaminérgica y la actividad motora presentada por las ratas.

#### **4.7. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS**

Tres días posteriores a la lesión (6 días pn), los animales fueron trasplantados. Un grupo conformado por 19 animales se inyectó unilateralmente con las siguientes coordenadas: AP=-4.2, LM =  $\pm 1.9$  y DV=-4.6 y se sacrificó al día 33 pn. De los 19 animales, 9 se trasplantaron con neuronas DAs y 10 fueron inyectados con medio N2. A los 19 días de edad se realizó la prueba de actividad y a los días 21 pn la prueba de rotación. Para la prueba de rotación los animales fueron administrados subcutáneamente con 0.05 mg/kg de peso de apomorfin. Los animales fueron colocados en los rotómetros (Med Associates Inc) y monitoreados por 30 minutos. Los giros fueron registrados por una computadora a través del programa Roto Rat.

Con la finalidad de analizar la sobrevivencia de las células trasplantadas a través del tiempo, un segundo grupo de animales fue trasplantado, y sacrificado a diferentes tiempos: día 6, 14, 21 y 28 pn. En este grupo de animales se realizaron dos depósitos de células con las siguientes coordenadas: AP = -3.0 LM =  $\pm 1.1$  y DV = -4.6 y AP = -2.5 LM =  $\pm 1.1$  y DV = -4.6]. Para facilitar la localización del trasplante, en algunos casos antes de ser trasplantadas, las células se marcaron con el colorante Hoechst. Las células se incubaron por diez minutos con Hoechst con una concentración final de 5  $\mu$ M. Aquellos animales que llegaron a los 19 días de edad se les realizó la prueba de actividad y aquellos que llegaron a los 21 días, se les realizó la prueba de rotación.

#### **4.8. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS A NEURONAS DOPAMINÉRGICAS**

Las neuronas DAs que se emplearon para realizar el trasplante se obtuvieron a partir de la diferenciación de dos líneas celulares y siguiendo el protocolo de 5 etapas descrito por Lee y colaboradores en el 2000.

Las líneas celulares empleadas fueron la R1 y la B5, esta última expresa la proteína verde fluorescente (GFP), en todas las células, de manera constitutiva.



El protocolo consta de 5 etapas las cuales se resumen a continuación:

<b>Etapa</b>	<b>Eventos por etapa.</b>
Etapa 1	<b>Expansión de las CTE indiferenciadas</b> Población crecida en cajas de cultivo gelatinizadas. Medio para CTE en presencia de LIF
Etapa 2	<b>Generación de cuerpos embrionarios.</b> Cultivo en suspensión por 4 días en medio para CTE para formar cuerpos embrionarios
Etapa 3	<b>Selección células positivas a nestina en un medio definido para seleccionar CTN.</b> Cultivo en cajas para cultivo con medio ITSFn durante 8-10 días.
Etapa 4	<b>Expansión de células nestina-positivas. Proliferación de las células troncales neurales, en presencia de mitógenos (factor de crecimiento fibroblástico).</b> Crecer en medio N2 con factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) en cajas cubiertas con laminina por 6 días.
Etapa 5	<b>Diferenciación .</b> Se retira el bFGF del medio N2.

## V. RESULTADOS

### 5.1. LOCALIZACIÓN DE LAS COORDENADAS PARA EL DEPÓSITO DE 6-OHDA EN VENTRÍCULOS EN RATAS DE 3 DÍAS PN

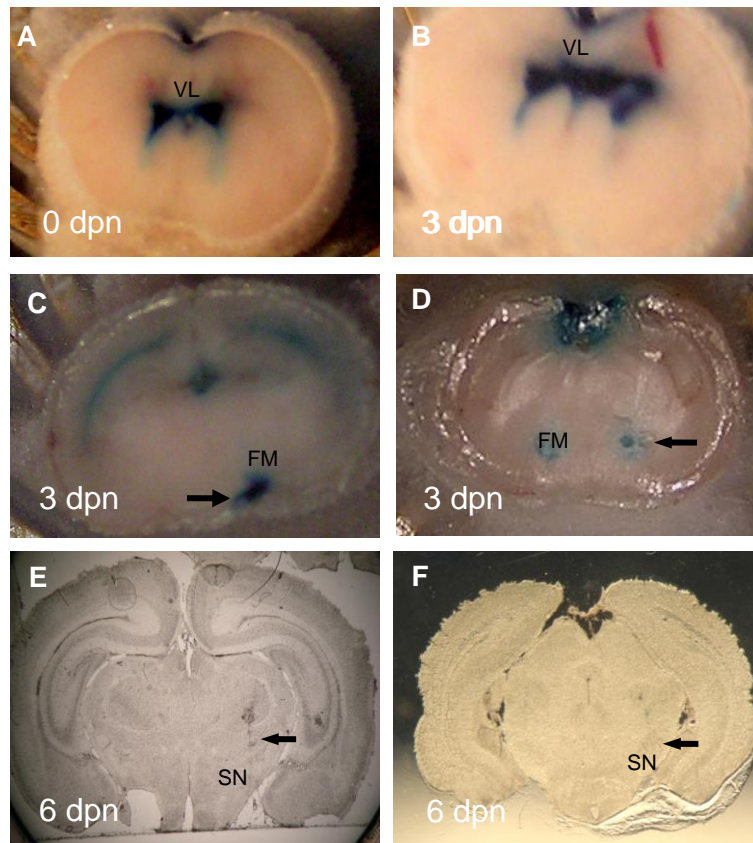
Con la finalidad de conocer si las coordenadas reportadas por Nikkah, *et al.*, (1995) para la inyección de 6-OHDA en VL de ratas de 0 días pn podían emplearse para ratas de 3 días pn, se realizó primero la inyección en VL con azul de metileno por medio de cirugía estereotáxica en ratas de 0 días pn y posteriormente en ratas de 3 días pn (Fig. 11B). Las coordenadas empleadas fueron: AP = -0.6; LM =  $\pm$  0.8, DV= -2.1 respecto a bregma.

En los cortes coronales obtenidos se observa el azul de metileno dentro de los VL de las ratas de 0 días pn (Fig. 11A) como de las ratas de 3 días pn (Fig. 11B); lo cual indica que las coordenadas para VL en neonatos de 0 días pn pueden emplearse para ratas de 3 días pn.

Con la finalidad de lograr una inyección más precisa y empleando una menor cantidad de 6-OHDA, se probó si la inyección de 6-OHDA en FM podía emplearse para lograr la denervación dopaminérgica requerida, para lo cual, se probaron las coordenadas empleadas por Mennicken, *et al.*, (1995) y Abrous, *et al.*, (1990). Después de realizar las inyecciones de colorante, se observa que las coordenadas reportadas en la literatura para FM de rata de 3 días pn, no permitieron llegar al área deseada (Fig. 11C), por lo que se ajustaron las coordenadas hasta encontrar aquellas en donde el colorante fuera depositado en FM. Las coordenadas que permitieron lo anterior fueron: AP = -0.6; LM =  $\pm$  1.1, DV= - 4.8 respecto a bregma (Fig. 11D).

Con el propósito de establecer si las coordenadas para la inyección en la SN en ratas de 3 días pn podían emplearse en ratas de 6 días pn, se inyectó por medio de cirugía estereotáxica 1  $\mu$ L de azul de metileno con las coordenadas para ratas de 3 días pn: AP=-3.7, LM =  $\pm$ 1.6 y DV=-4.3 en ratas de 6 días pn. Se observó que la inyección del colorante usando estas coordenadas no permitía un depósito en la SN (Fig. 11E), por lo que fueron probadas otras coordenadas que se describen en la sección 4.3. De

todas las coordenadas ensayadas se encontró que las coordenadas AP=-4.2, LM =  $\pm 1.9$  y DV=-4.6 eran las más adecuadas para lograr un depósito en la SN en ratas de 6 días pn (Fig. 11F).



**Fig. 11. Localización de la inyección en ventrículos laterales, fascículo medial y sustancia nigra.** En la figura A y B se muestra el depósito del colorante en los ventrículos laterales (VL) empleando las coordenadas: AP = -0.6; LM =  $\pm 0.8$ , DV = -2.1. A) rata de 0 días pn. B) ratas de 3 días pn. C) Depósito del colorante en rata de 3 días pn, con las siguientes coordenadas: AP = -0.6; LM =  $\pm 1.1$  y DV = - 5.8; se observa que el depósito del colorante no se encuentra en el fascículo medial (FM). D) Inyección con las coordenadas ajustadas para FM en rata de 3 días pn [coordenadas: AP = -0.6; LM =  $\pm 1.1$  y DV = - 4.8]. E - F) Muestran la localización del depósito de azul de metileno en la SN empleando las coordenadas AP= -3.7, LM =  $\pm 1.6$  y DV= -4.3 (E) y AP=-4.2, LM =  $\pm 1.9$  y DV=-4.6 (F). Las flechas en E y F muestran el tracto de la aguja y el sitio donde cae el colorante.

## 5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA LESIÓN CON 6-OHDA

La estandarización de la lesión con 6-OHDA consistió en que, a partir de la inyección bilateral de 6-OHDA en los VL o en FM al día 3 pn, se logre la muerte de las neuronas DAs. De acuerdo a reportes previos (Shaywitz, *et al.*, 1976) tras la muerte de las

neuronas DAs las ratas al día 19 pn deberán mostrar un aumento en la actividad motora.

El éxito de la lesión dependió además, de la administración de la dosis de 6-OHDA en la región correcta, de la recuperación de los neonatos y de su aceptación por la madre posterior a la cirugía. El lograr que el depósito se colocara en la región correcta estuvo sujeto a la adecuada orientación de la cabeza de las ratas, así como en localización precisa de bregma.

### **5.2.1. Correlación entre la inmunoreactividad a TH y la actividad locomotora**

A los 19 días pn se evaluó la actividad locomotora de 36 ratas intactas, 35 inyectadas intraventricularmente con SSF, 5 inyectadas con 6-OHDA en FM y 44 inyectadas con 6-OHDA en VL. Los animales fueron sacrificados 2 semanas después (33 días pn) de la prueba de actividad motora. La extensión de la denervación de las neuronas DAs después de 30 días de la inyección de 6-OHDA en los VL fue analizada por medio de la inmunoreactividad a TH en el estriado y en la SN. Como ya se ha mencionado la SN es el sitio donde se encuentran las neuronas DAs que liberan la DA en el estriado.

Realizando cortes coronales de 50  $\mu\text{m}$  en la dirección antero-posterior de los cerebros de las ratas, se identificó, por inmunofluorescencia, al estriado y posteriormente a la SN. El estriado se encuentra en la parte anterior del cerebro y se identifica como una amplia zona que abarca dos grandes lóbulos, uno del hemisferio izquierdo y otro del hemisferio derecho (Fig. 12A); en cada uno de los lóbulos puede reconocerse fácilmente a los VL, que sirven como referencia. La SN se encuentra en la parte ventral del cerebro medio y se identifica por la presencia de somas neuronales en cada uno de los hemisferios, arreglados en bandas características: con una mayor densidad cerca de la línea media y con menor densidad de los somas conforme se avanza en dirección lateral (Fig. 12B).

El estriado de ratas inyectadas con SSF (grupo sham) cuenta con un gran número de proyecciones DAs, que se manifiesta por una marcada inmunoreactividad a TH (color verde intenso en la figura 12A), además puede observarse con claridad la diferencia en inmunoreactividad entre la corteza cerebral y el estriado (Fig. 12A).

En la SN del grupo sham, se observan somas neuronales de un color verde intenso, e incluso, se alcanzan a ver algunas proyecciones neuronales (flechas blancas en la figura 12B).

Analizando los cortes de las ratas inyectadas con 6-OHDA, se observa que hay cortes que muestran una denervación dopaminérgica parcial (Fig. 12C y D) y otros que muestran denervación dopaminérgica total (Fig. 12E y F). En los cerebros de rata con una denervación dopaminérgica parcial, puede observarse un estriado con menor presencia de TH, comparada con el grupo de ratas sham; además hay sólo una modesta diferencia de inmunorreactividad entre el estriado y la corteza cerebral (Fig. 12C). La SN de estas ratas muestra somas neuronales con una inmunorreactividad menor a la de la SN del grupo sham (comparar Figs. 12B y D).

Los cerebros de las ratas con una denervación dopaminérgica total muestran un estriado con una nula inmunorreactividad a TH (Fig. 12E) y una SN con una marcada disminución en el número de neuronas TH positivas (Fig. 12F). Las ratas con denervación dopaminérgica parcial serán nombradas como ratas no lesionadas y las ratas con una denervación dopaminérgica total serán nombradas como ratas lesionadas.

A continuación, se compararon los valores de actividad locomotora del grupo sham inyectado con SSF (referidos en el texto como valores normales de actividad) con los del grupo inyectado con 6-OHDA. Como se mencionó previamente, no en todos los casos del grupo inyectado en VL o en FM con 6-OHDA se observó una lesión.

Del total de los 5 animales inyectados con 6-OHDA en FM (indicado en la figura 12G como FM S/L) al día 3 pn, ninguno tuvo valores de actividad significativamente mayores que el grupo de ratas sham, ni presentó disminución en la reactividad de TH (datos no mostrados).

Para el caso de las inyecciones de 6-OHDA en VL, encontramos que sólo 4 animales mostraron lesión y valores de actividad motora significativamente mayores que los del grupo sham (indicado en la figura 12G como VL L) y los 40 animales restantes no mostraron valores de actividad distintos a los controles, ni lesión dopaminérgica (marcados como VL S/L en la figura 12G). Por lo tanto, se observó que el grado de

lesión se correlaciona con la actividad locomotora medida como distancia total al analizarse al día 19 pn.

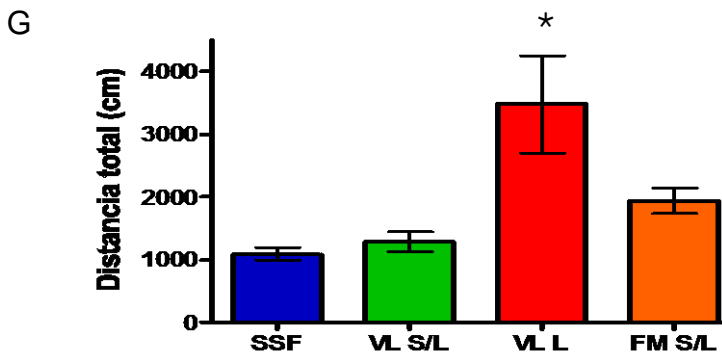
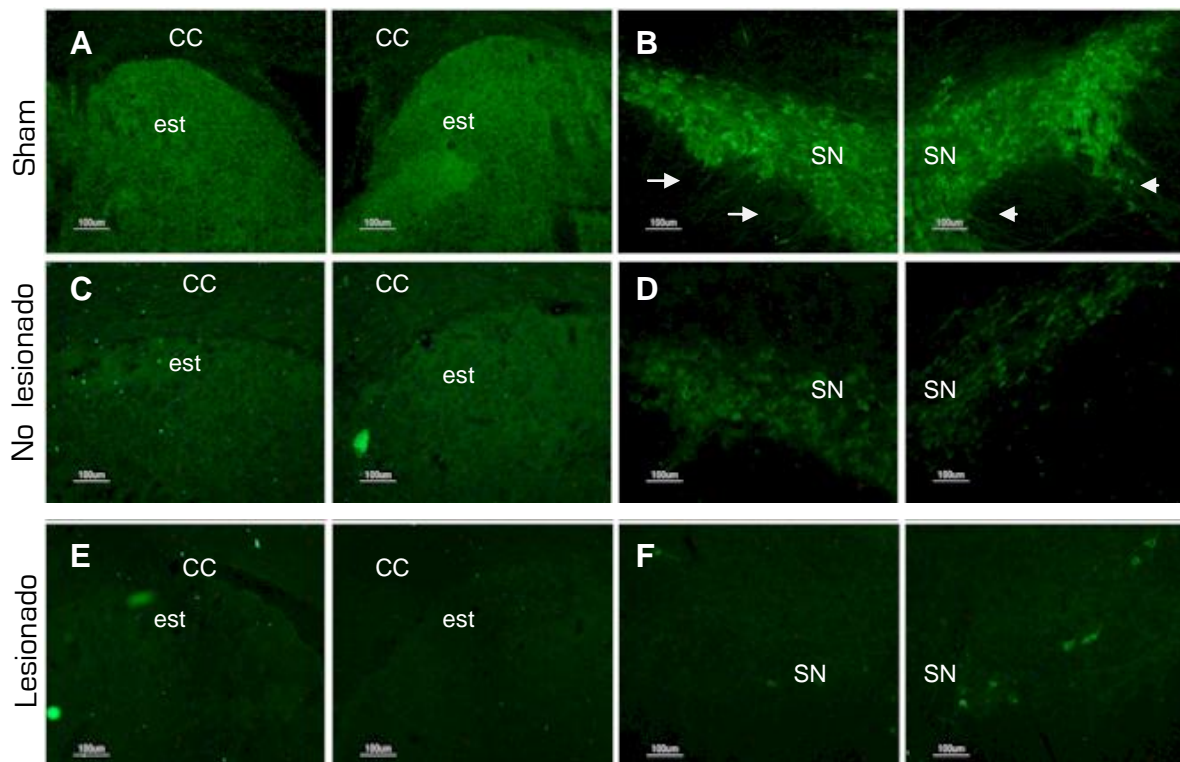


Fig. 12. Estandarización de la lesión con 6-OHDA: correlación entre la actividad motora y la denervación dopaminérgica. A-P) Inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (TH) en el estriado (est) y sustancia nigra (SN) de ratas inyectadas con 6-OHDA. Cada par de fotografías muestran primero el lado izquierdo y después el lado derecho. A - B) Muestran la inmunorreactividad a TH de ratas inyectadas con SSF. C - F) Ratas inyectados con 6-OHDA al día 3 pn. C - D) Ratas inyectadas con 6-OHDA lesionadas parcialmente. E - F) Ratas inyectadas con 6-OHDA lesionadas. G) Comparación de los valores de actividad motora entre los diferentes grupos. No hay diferencia significativa entre el grupo de ratas sham [inyectado con SSF], el grupo inyectado con 6-OHDA en ventrículos laterales sin lesión (VL S/L) y el grupo inyectado en fascículo medial sin lesión [FM S/L]. \*  $p < 0.05$  relativo a los otros grupos.

### 5.3. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE 6-OHDA EN LOS VENTRÍCULOS LATERALES

Se evaluó si las neuronas DAs diferenciadas a partir de CTE pueden crecer sus axones hasta el estriado cuando son trasplantadas en la SN de ratas neonatas. Para poder evaluar lo anterior, se realiza una lesión bilateral de las neuronas DAs de la SN, inyectando 6-OHDA en ambos VL; posteriormente se trasplantaron las neuronas DAs en uno de los hemisferios. Suponiendo que las neuronas DAs trasplantadas en la SN extiendan sus axones hasta el estriado y liberen DA en dicho hemisferio, el hemisferio contrario, que no recibió trasplante, se encontrará hipersensible por no haber recibido DA. Por lo tanto, un agonista dopaminérgico como la apomorfina sobreexcitará al hemisferio sensible (el hemisferio sin trasplante) manifestándose una conducta de giro contralateral al lado denervado.

Para evaluar lo anterior, se formaron tres grupos: uno inyectado al día 3 pn en VL con SSF que sirvió como control de lesión (grupo sham), otro inyectado con 6-OHDA en VL al día 3 pn y con medio N2 al día 6 pn, que se empleó como control de trasplante (grupo lesionado) y otro inyectado con 6-OHDA en VL al día 3 pn y trasplantado en el hemisferio derecho con neuronas DAs al día 6 pn.

Al día 6 pn se trasplantaron 150 000 células en la SN del hemisferio izquierdo de 55 ratas previamente inyectadas bilateralmente al día 3 pn con 55 µg de 6-OHDA; 22 ratas más fueron inyectadas con medio N2 en lugar de células (grupo lesionado); un grupo de 17 ratas no fue lesionado, sino sólo inyectado bilateralmente en los VL con 5 µL de SSF (grupo sham). Al día 19 pn, se realizó la prueba de actividad motora y, a los 21 días pn, la prueba de rotación inducida por apomorfina. Se espera que ratas recuperadas de la lesión muestren una conducta rotatoria mayor a 5 giros/min. (Nikkhah, *et al.*, 1995b).

#### 5.3.1. Correlación entre la actividad locomotora, la denervación dopaminérgica y la conducta de giro de las ratas trasplantadas

Al comparar el grupo sham (Fig. 13A y B), con las ratas inyectadas con 6-OHDA al día 3 pn e inyectadas en la SN con medio N2, se observó que sólo 4 de ellas presentaron una muerte considerable de las neuronas DAs (Fig. 13E y F); las 40

restantes mostraron una muerte dopaminérgica parcial (Fig. 13C y D). Consistentemente con los datos anteriores, las ratas no lesionadas mostraron valores de actividad semejantes a los del grupo sham y las ratas lesionadas mostraron un aumento significativo de la actividad locomotora (Fig. 13M).

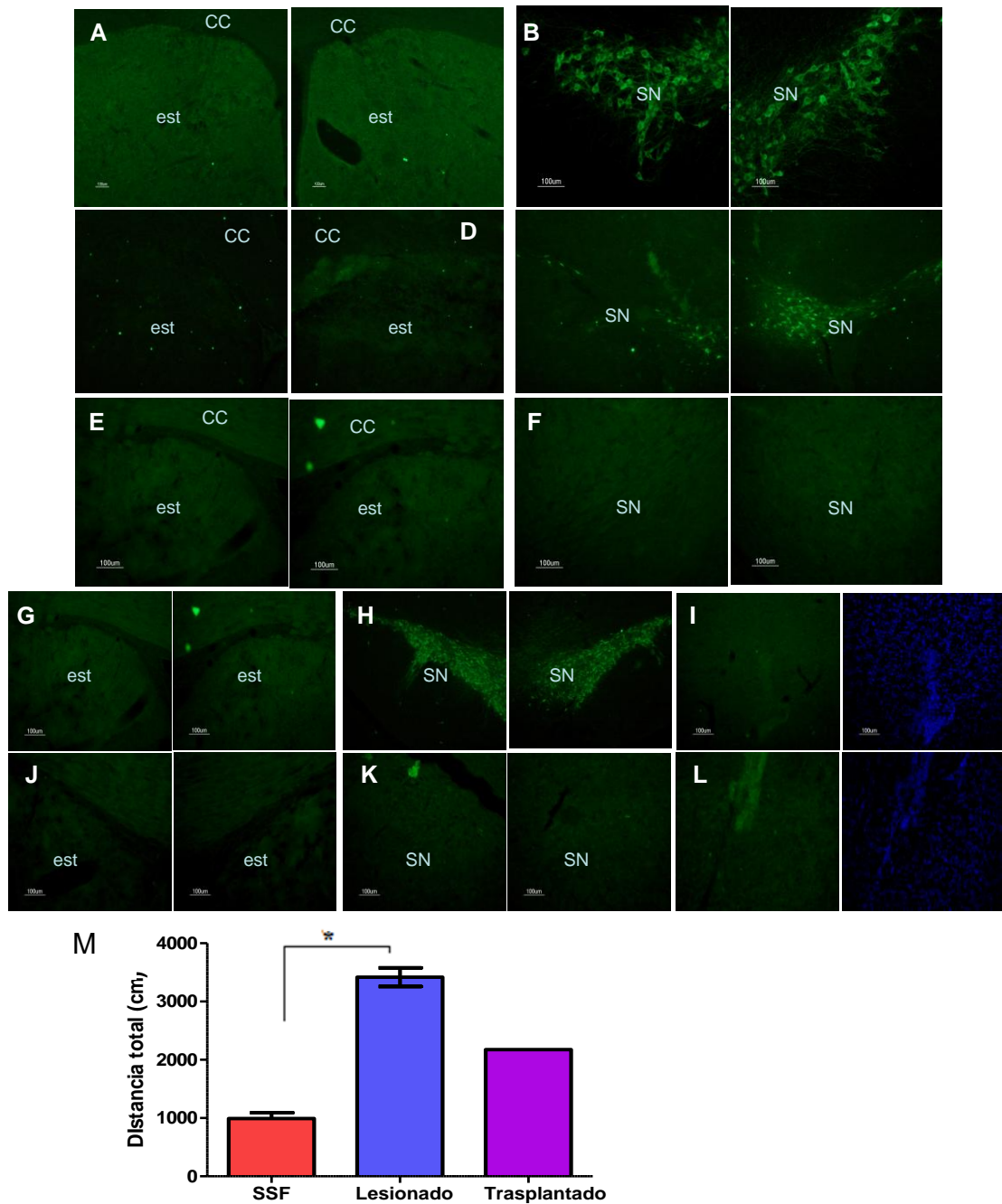
Para el caso de los animales trasplantados, se encontró que algunos mostraban una denervación total de las neuronas DAs y el resto de los animales no se lesionaron después de inyectarse la 6-OHDA. En los animales trasplantados, además de analizar el grado de lesión, se realizó la búsqueda del trasplante. El trasplante se esperaba ver como un cúmulo de células con algunas células TH positivas en, o muy cerca, de la SN. El trasplante se encontró tanto en animales no lesionados (Fig. 13G - I) como en animales lesionados (Fig. 13J - L).

Se observó que aquellos animales que no fueron lesionados pero que se encontró el trasplante, mostraron valores de actividad esperados para una rata no lesionada (datos no mostrados) y que aquellos animales en los que se encontró el trasplante mostraban valores de actividad menores que el grupo lesionado y mayores que el grupo control (Fig. 13M).

### **5.3.2. Localización del trasplante**

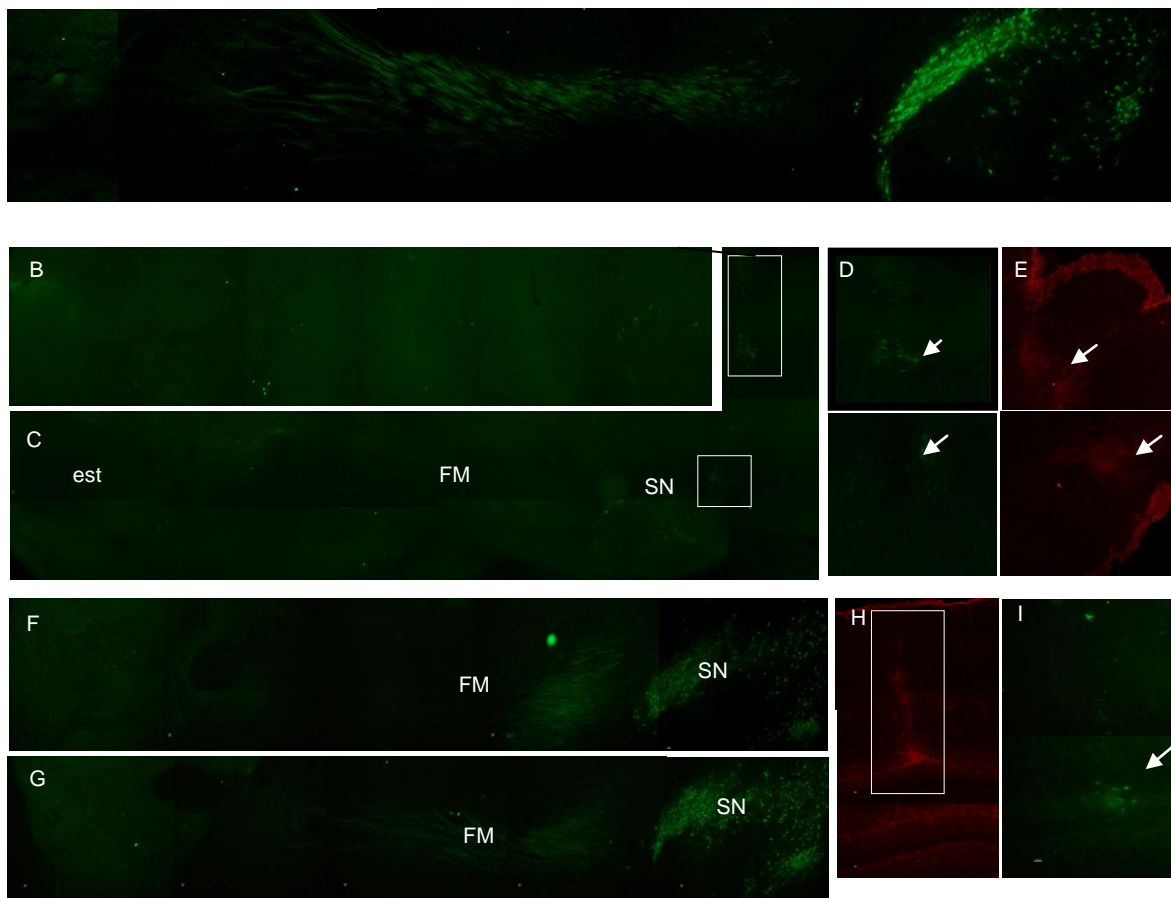
A partir de los cortes coronales podemos localizar el trasplante, pero no se puede ver el crecimiento dirigido de los axones; por lo que realizaron corte sagitales en vez de coronales para la localización del trasplante a través de la vía nigro-estriatal completa. El que ratas inyectadas con 6-OHDA y trasplantadas no estuviesen lesionadas, hace más difícil la localización del trasplante, ya que no hay manera de diferenciar, más que por morfología alterada, las células del trasplante de las células endógenas. Por esta razón se marcó con GFAP, para poder evidenciar de manera más clara la localización del trasplante, ya que se espera que en el sitio del trasplante y a lo largo de la trayectoria de la aguja haya astrogliosis.





**Fig. 13.** Inyección de 6-OHDA al día 3 pn, seguida de inyección con medio N2 o neuronas Das al día 6pn. A-B) Rata sham , inyectado con SSF al día 3 pn, [A] muestra el estriado (est) y [B] la SN. C-F) Grupo de ratas inyectadas con 6-OHDA en VL a los 3 días pn e inyectados con medio N2 en SN al día 6 día pn. G-L) Grupo de ratas inyectado con 6-OHDA al día 3 pn y con neuronas DAs al día 6 pn. En A se observa claramente la diferencia entre la corteza cerebral (CC) y el est. En B se observa la SN con gran cantidad de células positivas a TH. C-D) muestra el est (C) y la SN (D), de una rata parcialmente lesionada. E-F) Se muestra el estriado derecho e izquierdo (E) y la SN (F) de una rata lesionada. G-I) Cerebro de rata no lesionada con trasplante En G se muestra el estriado, en H la SN y en I se muestra cúmulo de células positivas a TH (panel verde) y sus núcleos marcados con Hoestch (panel azul). J-L) Cerebro de rata lesionada con trasplante En (J) se muestra el estriado, en (K) la SN y en (L) se muestra cúmulo de células positivas a TH (panel verde) y sus núcleos marcados con Hoetsch (panel azul). M) Comparación de los valores de actividad entre las ratas inyectadas con SSF, las ratas inyectadas con 6-OHDA al día 3 pn y con medio N2 al día 6 pn, que si fueron lesionadas y las ratas lesionadas y trasplantadas con neuronas DAs. \* Diferencia significativa. Sólo se encontró una rata lesionada y trasplantada que es el valor que se muestra en la grafica como el grupo trasplantado.

En la figura 14 se muestra el trasplante de neuronas DAs en una rata lesionada (Fig. 14B y C) y en una rata no lesionada (Fig. 14F y G). Realizando un acercamiento del sitio donde cae el trasplante con neuronas TH positivas en la rata lesionada (recuadros blancos en la figura 14 D), puede observarse que dichas células se encuentran agrupadas de una forma diferente a como se agrupan normalmente (comparar Fig. 14A y D). Además se observa que en el sitio en donde se encuentra el trasplante y cerca de él hay un aumento de la astrogliosis (Fig. 14E). En la rata no lesionada (Fig. 14F y G) no puede diferenciarse el trasplante de las células endógenas

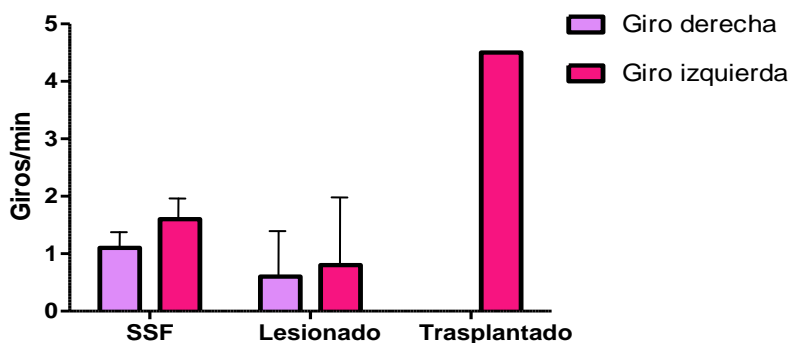


**Fig. 14. Localización del trasplante.** A) Corte sagital de una rata sham. Se muestra la SN el fascículo medial (FM) y el estriado (est). B-E). Cortes de cerebro de rata transplantada y sacrificada a los 13 días pn. A) Hemisferio derecho lesionado. B) Hemisferio izquierdo lesionado con trasplante [cabeza de flecha]. El recuadro blanco indica el tracto de la aguja. D-E) Aumento del tracto de la aguja en donde se observan las célula TH positivas en verde (D), la glía reactiva en rojo (E). F-G). Rata transplantada pero no lesionada. F) Hemisferio derecho de rata transplantada. G) Hemisferio izquierdo de rata transplantada, no se puede diferenciar el trasplante de las células endógenas, pero si el tracto de la aguja cerca del hipocampo (H), el tracto de la aguja que coincide con una mayor astrogliosis [rojo] en el cerebro de la rata. I) Aumento del recuadro blanco en (H) y marcado contra TH (en verde).

(ambas positivas a TH, marcaverde). Sin embargo, analizando regiones en la parte superior de la SN, puede observarse el tracto de la aguja, que se puede diferenciar por el aumento en la astrogliosis en esa zona (marca roja en la figura 14H). Realizando un acercamiento del recuadro blanco de la figura 14H y marcando contra TH, puede observarse que en el trayecto de la aguja se encuentran neuronas TH positivas (marca verde en la figura 14 I).

### 5.3.3. Prueba de rotación.

Al día 21 pn, se realizó la prueba de rotación inducida por apomorfina, para lo cual se inyectó 0.05 mg/kg de apomorfina subcutáneamente. Los giros de las ratas fueron monitoreados por 30 minutos. Los resultados de la prueba de rotación a los 21 días pn se muestran en la Fig. 15. Se observa que las ratas lesionadas y no trasplantadas muestran valores de 0 hasta 1.6 giros/min y desde 0 hasta 2.1 a la izquierda. Las ratas no muestran asimetría en los giros. En cuanto a las ratas trasplantadas, se observa que sólo una de las ratas (en donde se encontró el trasplante por medio de inmunohistoquímica) muestra una conducta de giro (4.5 giros a la izquierda/min; Fig. 15C). Esta rata muestra un valor de actividad fue bajo a pesar de la denervación dopaminérgica, lo cual quiere decir que es probable que la actividad en esta rata haya bajado debido a la liberación de dopamina por parte de las células trasplantadas. Lo hipótesis anterior puede reforzarse con el dato de rotación; si el trasplante está liberando dopamina la rata girará al lado ipsilateral al trasplante, como ocurrió en este caso en donde la rata tuvo un total de giros hacia la izquierda igual a 4.5 giros/min. Lo anterior sugiere que las células del trasplante liberan DA, pero no se observó la reinervación hacia el estriado.



**Fig. 15. Prueba de rotación a los 21 días pn.** El grupo de ratas sham, inyectados con SSF al día 3 pn y el grupo de ratas lesionado, inyectado con 6-OHDA al día 3 pn que mostró denervación dopaminérgica, no muestran asimetría en los giros. De todas las ratas en donde se encontró el trasplante sólo una se encontró con lesión total (dato mostrado como trasplantado) por lo que no se muestra el error estándar.

#### **5.3.4. Grupo de ratas trasplantadas con células marcadas**

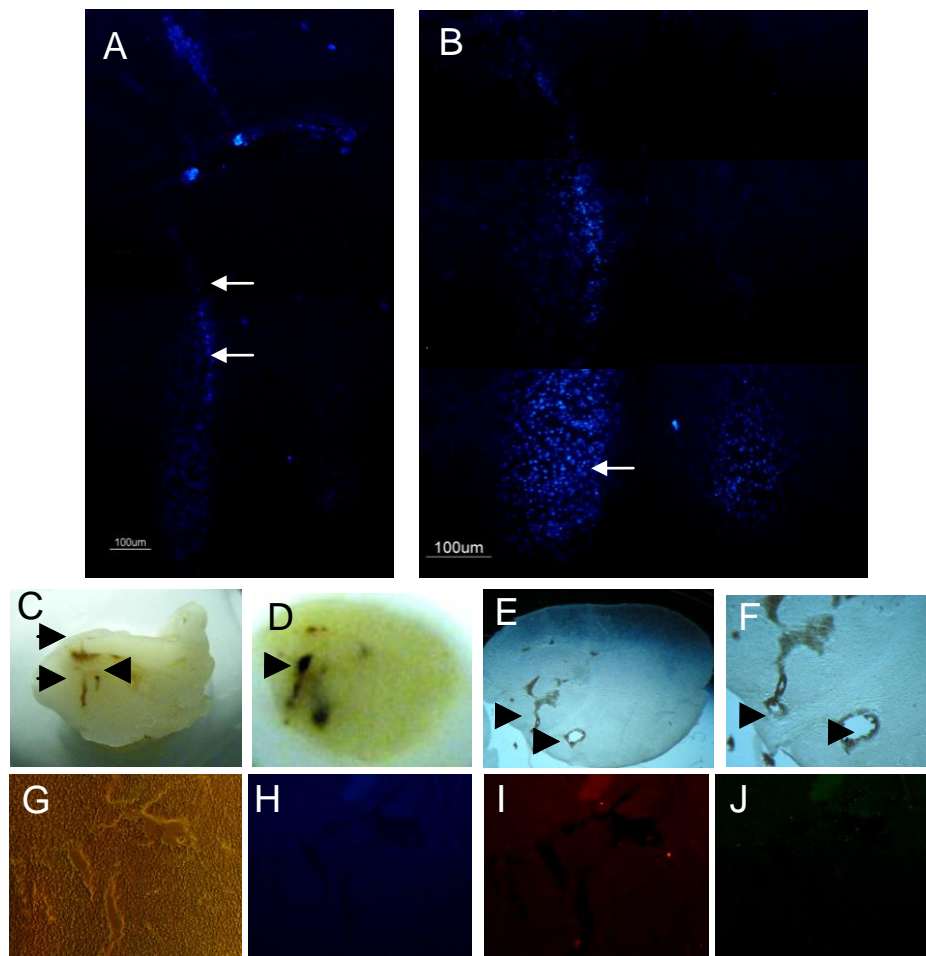
Es importante mencionar que un grupo importante de ratas que no fue lesionado y en donde no se encontró el trasplante ( $n = 48$ ; datos no mostrados). Dada la dificultad para encontrar el trasplante al día 33 pn, se realizó un grupo de ratas en donde se realizaron dos depósitos de  $0.25 \mu\text{L}$  con 40 000 células cada uno de acuerdo con las siguientes coordenadas ( $\text{AP} = -3.0$   $\text{LM} = \pm 1.1$  y  $\text{DV} = -4.6$  y  $\text{AP} = -2.5$   $\text{LM} = \pm 1.1$  y  $\text{DV} = -4.6$ ). Las células trasplantadas expresaban la GFP y se marcaron con Hoechst antes de ser trasplantadas, con la finalidad de poderlas diferenciar de la células endógenas además de facilitar la localización de las células trasplantadas.

##### ***5.3.4.1. Ratas sacrificadas al día 6 postnatal***

Para asegurarnos que efectivamente se estuvieran depositando las células a través del sistema de inyección, posterior a la inyección de las células se sacrificó una rata, y por medio de microscopía de fluorescencia se realizó la búsqueda de las células marcadas con Hoechst. Al realizar los cortes para su análisis por microscopía de fluorescencia se observó en el cerebro que se estaba cortando la traza de la entrada de la aguja (Fig. 16A).

Al analizar dichos cortes se observaron claramente los dos depósitos de células trasplantadas marcadas con Hoechst, así como el trayecto que siguieron a través de la aguja (Fig. 16B y C).

Se analizó un segundo cerebro, siguiendo el mismo procedimiento. Al ir cortando el cerebro, se observó claramente el trayecto de la aguja y los dos depósitos de células (Fig. 16D y E). Al analizarse los cortes por microscopía de fluorescencia no se encontraron células marcadas con Hoechst, por lo que se prosiguió a la realización de la inmunohistoquímica, en la que se marcó contra GFP y TH. No se observó la presencia de células marcadas con Hoechst, ni con GFP, ni con TH (Fig. 16K - N), probablemente, por el gran daño observado en el tejido (Fig. 16F).



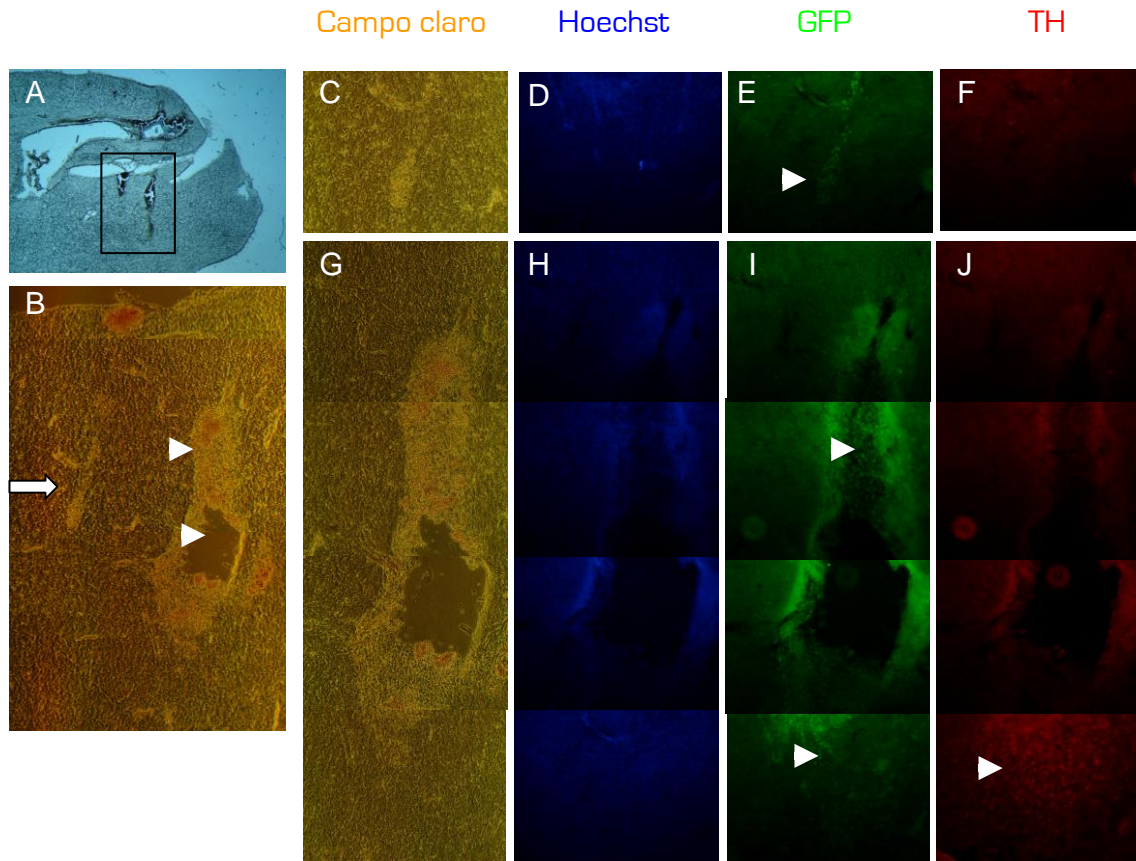
**Fig. 16. Localización del trasplante en ratas sacrificadas al día 6 pn.** A) Se muestra los dos depósitos de las células trasplantadas. B) Acercamiento del tracto de la aguja (flechas) y depósito de las células trasplantadas marcadas con Hoechst. C) Cerebro del cual se obtuvieron las imágenes A y B que muestra el tracto de la entrada de la aguja (flechas). D - N) Imágenes de una segunda rata sacrificada después del trasplante de las células con una lesión más severa a causa del trasplante. D y G) Cerebro montado en el criostato en donde se observa el tracto de la aguja (D) y el depósito de las células (G; cabezas de flecha). E) Corte en flotación a la altura que se muestra en D. F) acercamiento del sitio donde fueron depositadas las células. H) Corte en flotación a la altura del cerebro que se muestra en G. I) Acercamiento de depósito de las células en H. J) Acercamiento del mismo cerebro en I, en donde se observa células del trasplante flotando. K-N) Acercamiento del recuadro marcado en G. K) Imagen en campo claro. L) Marca con Hoechst, en canal azul. M) Inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (TH), en canal rojo. N). Inmunohistoquímica contra la proteína verde fluorescente (GFP), canal verde.

#### ***5.3.4.2. Ratas sacrificadas al día 14 postnatal***

Después de realizado el trasplante al día 6 pn un grupo de 4 ratas fue sacrificado al día 14 pn. En los cortes de dichos cerebros aún se observa la entrada de la aguja claramente (Fig. 17A). Al realizar los cortes correspondientes para realizar la inmunohistoquímica, se observó que, de igual manera que en uno de los cerebros sacrificados al día 6 pn, parte del tejido se encontraba muy dañado (Fig. 17B). Sin



embargo, aún se logra ver claramente la entrada de la aguja de los dos depósitos (Fig. 17B). En este cerebro la marca de Hoechst se ha perdido (Fig. 17D y H). Sin embargo, pueden observarse claramente células GFP positivas en los trayectos que siguió la aguja (Fig. 17B y I). No se encontraron células positivas a TH; sólo en uno de los depósitos en donde el tejido está muy dañado, pueden verse algunas células TH positivas (Fig. 17F y J).



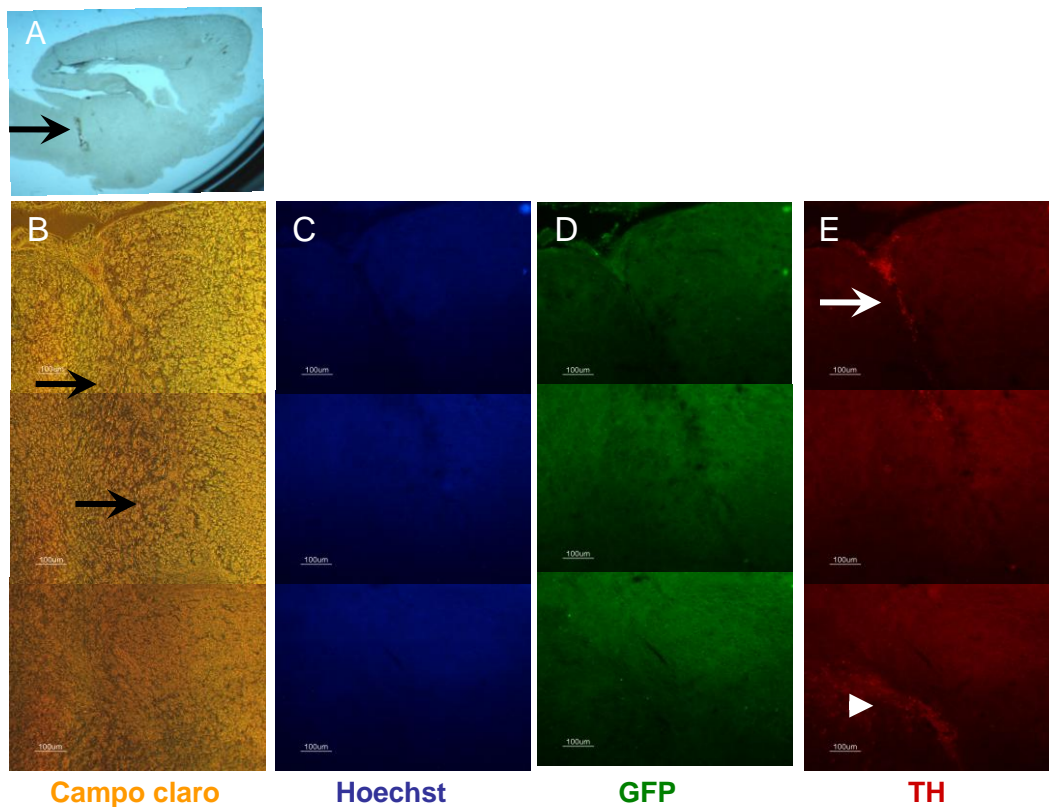
**Fig. 17. Localización del trasplante en ratas sacrificadas al día 14 pn.** A) Corte en flotación en donde se observan los trayectos que siguió la aguja (recuadro negro). B) Imagen en campo claro que muestra un acercamiento de los trayectos de la aguja (flecha blanca, primer depósito; cabezas de flecha, segundo depósito). C - F) Acercamiento del primer depósito en B. G - J) Acercamiento del segundo depósito. C y G) Imágenes en campo claro. D y H) núcleos marcados Hoechst [canal azul] E e I) Proteína verde fluorescente (GFP), la cabeza de flecha muestra células GFP positivas en color verde. F y G) Marcaje con tirosina hidroxilasa (TH), la cabeza de flecha muestra células TH positivas marcadas en rojo.

### 5.3.4.3. Ratas sacrificadas al día 21 postnatal

Un grupo de 4 ratas fue sacrificado al día 21 pn posterior a la prueba de actividad [19 días pn] y de rotación [21 días pn]. Ninguno de los animales mostró hiperactividad ni asimetría en los giros.

Al analizarse estos cerebros por medio de inmunofluorescencia, se observó la presencia de neuronas TH positivas trasplantadas y endógenas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de actividad y de rotación.

Al realizar la inmunohistoquímica de la zona se observa en campo claro el trayecto de la aguja de forma clara (Fig. 18A). En el canal azul no se observan células marcadas con Hoechst, lo cual quiere decir que la marca de Hoechst se pierde al día 21 pn.

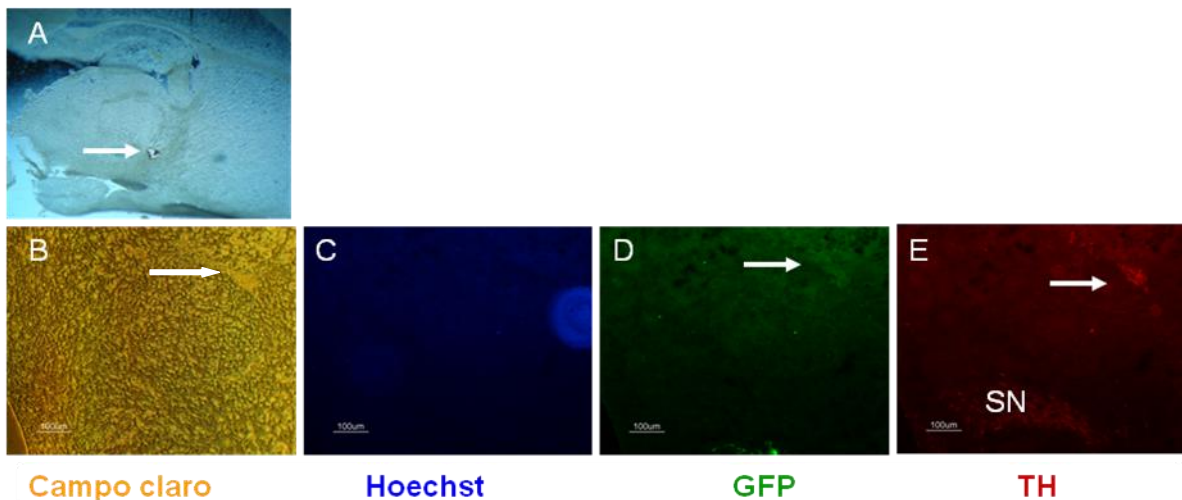


**Fig. 18. Localización del trasplante en ratas sacrificadas al día 21 pn.** A) Corte en flotación en donde se observa el trayecto que siguió la aguja [flecha negra]. B) Acercamiento de la imagen en campo claro en donde se muestra el trayecto de la aguja [flechas negras]. C) Imagen en el canal azul, donde se muestra la ausencia de núcleos con Hoechst. D) Canal verde en donde se observa ausencia de células GFP positivas. E) Células TH positivas a lo largo del trayecto de la aguja [flecha blanca]; también se observa también TH positivas endógenas [cabeza de flecha].

(Fig.18C). En la figura 18C, se observan células positivas a TH a lo largo del trayecto de la aguja y en el canal verde donde deberían de verse células GFP positivas no se observa fluorescencia.

#### ***5.3.4.4. Ratas sacrificadas al día 28 postnatal***

Un grupo de 4 ratas fue sacrificado al día 28 pn, posterior a la prueba de actividad [19 días pn] y de rotación [21 días pn]. Ninguno de los animales mostró hiperactividad ni asimetría en los giros. Al analizarse sus cerebros por medio de inmunofluorescencia, se observó la presencia de neuronas TH positivas trasplantadas y endógenas, lo que concuerda, al igual que en las ratas sacrificadas al día 21, con los resultados obtenidos en la prueba de actividad y de rotación. No se observó que el trayecto de la aguja, en el cerebro cortado en el criostato, pero al obtener los cortes, se observó un pequeño depósito de células (Fig. 19A). Dicho depósito observado en el corte en flotación coincidió con el depósito de células observado en campo claro (Fig. 19B) y que son positivas a TH (Fig. 19E). En el canal azul no se observan células marcadas con Hoechst, en el verde se observa una marca aunque no muy clara de células GFP positivas.



**Fig. 19. Localización del trasplante en ratas sacrificadas al día 28 pn.** A) Corte en flotación en donde se observa depósito de las células (flecha). B) Imagen en el canal verde, células GFP positivas. C) Células TH positivas. D) canal en azul, donde se muestra ausencia de núcleos con Hoechst E) Imagen en campo claro donde se observa un acúmulo de células que coincide con la células TH positivas encontradas.



## VI. DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN

### 6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA LESIÓN CON 6-OHDA

La 6-OHDA es un análogo de la dopamina que puede ser transportado por las neuronas catecolaminérgicas, a través del transportador de dopamina (DAT; Jonsson y Sachs, 1970; Ljungdahl, *et al.*, 1971), provocando la muerte de las neuronas catecolaminérgicas de manera selectiva (Ungerstedt, 1968). Una vez que entra a las células, la 6-OHDA es oxidada rápidamente produciendo peróxido de hidrógeno y la quinona correspondiente (Graham, *et al.*, 1978; Gee y Davison, 1989). El peróxido de hidrógeno se convierte fácilmente en un radical libre por medio de la reacción de Fenton, produciendo estrés oxidativo que termina por matar a las células (Cadet, *et al.*, 1989; Ben-Shachar y Youdin, 1991; Kumar, *et al.*, 1995). La 6-OHDA también actúa inhibiendo al complejo I mitocondrial, impidiendo la formación de ATP, lo que trae como consecuencia la muerte neuronal (Glinka and Youdim, 1995; Glinka, *et al.*, 1996, 1997, 1998). Existen numerosos reportes en los que la inyección de 6-OHDA en los VL produce la muerte de las neuronas DAs (Archer, *et al.*, 1988; Bruno, *et al.*, 1986; Davids, *et al.*, 2002; Duncan, *et al.*, 1987; Luthman, *et al.*, 1990; Moy, *et al.*, 2001); sin embargo, en este trabajo se observó que tras la inyección bilateral de 55 µg de 6-OHDA en los VL, el porcentaje de ratas neonatas totalmente lesionadas fue muy bajo (12%). En un principio se pensó que la gran variabilidad en los resultados obtenidos se debía a que la 6-OHDA no se estaba inyectando en el sitio correcto, para lo cual se realizaron numerosas inyecciones con azul de metileno para verificar que la 6-OHDA se estuviera depositando en los VL. Junto con estas inyecciones, se procuró una colocación precisa del animal en el equipo y se eligieron animales del mismo peso (incluso en la misma camada hay gran variabilidad en el tamaño), ya que el cerebro neonato es muy pequeño y pequeñas desviaciones en la posición de la cabeza o pequeñas variaciones en el tamaño pudieran provocar cambios en la zona de inyección.

Se pensó también que la lesión parcial pudiera deberse a que la 6-OHDA, se oxida fácilmente. Para evitar su autooxidación se agrega ácido ascórbico, se mantiene en hielo y se protege de la luz. La función del ácido ascórbico es evitar la oxidación de la 6-OHDA (Heikkila y Cohen, 1972; Roginsky, *et al.*, 1997) y en el caso de que la 6-OHDA se oxidara, revierte esta oxidación; sin embargo, existen reportes

contradictorios en los cuales se demuestra que el ácido ascórbico, es incapaz de impedir la oxidación de la 6-OHDA o de regenerar la 6-OHDA [Nappi y Vass, 1994].

A pesar de las precauciones tomadas y de que se observó que la inyección del azul de metileno caía en los ventrículos laterales y difundía; el porcentaje de ratas lesionadas no aumentó. Aunque numerosos estudios demuestran que hay una lesión total tras la inyección en VL de 6-OHDA en neonatos, ninguno de ellos reporta el porcentaje de ratas lesionadas tras la inyección. La inyección de 6-OHDA, provoca la generación de especies reactivas de oxígeno, y daño neuronal, éste daño trae como consecuencia la activación de la glía [Li, *et al.*, 2005]. Los astrocitos reactivos secretan una serie de factores de crecimiento que, contrario a lo que se creía, estimulan, la sobrevivencia neuronal, el crecimiento axonal y la neurogénesis en cerebros adultos; además disminuyen la cantidad de radicales libres y el exceso de glutamato [Chen, *et al.*, 2005]. El gran número de ratas no lesionadas que se obtuvo en este trabajo pudiera deberse a una re-arborización de la neuronas sobrevivientes a la lesión o neurogénesis como lo reporta Parish en su modelo de lesión de 6-OHDA en salamandra en donde, 21 días posteriores a la lesión, observa neurogénesis y reconstrucción de la vía [Parish, *et al.*, 2007].

Se ha demostrado que existe una clara correlación entre el aumento en la actividad locomotora y la extensión de la denervación dopaminérgica [Archer, *et al.*, 1988; Avale, *et al.*, 2004], por lo que, valores por arriba de los valores de actividad de las ratas control nos asegura una denervación dopaminérgica casi completa. Al observar las inmunohistoquímicas de estas ratas puede observarse claramente que las ratas que muestran una mayor actividad, tienen una casi completa denervación dopaminérgica, a diferencia de la ratas que muestra una menor actividad, en donde la vía nigro-estriatal no se encuentra dañado (Fig. 12). En nuestro trabajo el grado de actividad se correlaciona con el grado de denervación dopaminérgica.

El porcentaje de ratas lesionadas en ratas inyectadas con 6-OHDA en VL fue del 12%. El éxito de la lesión depende, además de otros factores, de la correcta colocación en el aparato de cirugía estereotáxica, así como a la correcta localización de bregma.

Tras la muerte de neuronas DAs y la falta de dopamina en los cerebros neonatos hay un aumento en las proyecciones serotoninérgicas [Snyder, *et al.*, 1986], lo que se piensa es la causa de la hiperactividad motora observada en las ratas lesionadas [Avale, *et al.*, 2004]. El grado de hiperactividad correlaciona con el grado de lesión dopaminérgica [Miller, *et al.*, 1981; Zhang, *et al.*, 2001]. Se observó que aquellas ratas en las cuales hubo una discreta disminución del número de neuronas DAs, la actividad de las ratas aumentaba sólo un poco con respecto al control. Aquellas ratas en las cuales se observó una disminución mayor de las neuronas DAs, la actividad fue significativamente mayor a la de las ratas control. A pesar del bajo porcentaje de animales lesionados que obtuvimos con la inyección de 6-OHDA, obtuvimos una correlación directa entre el grado de lesión y la actividad de las ratas.

## 6.2. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Al día 6 pn se trasplantaron neuronas DAs diferenciadas *in vitro* a partir de células ES. Las ratas trasplantadas se sacrificaron al día 33 pn, una vez que se habían realizado las pruebas de actividad motora (para ver el grado de lesión) y la prueba de rotación (para ver liberación de dopamina en estriado, a causa de extensión de axones de las neuronas trasplantadas). La localización del trasplante, después de 27 días del trasplante (33 días pn) fue muy complicada ya que, como ya mencionó antes, un gran número de ratas no estaban lesionadas, por lo que diferenciar el trasplante de las células endógenas fue difícil. A pesar de ello, en dos de los cerebros se observó neuronas TH+, acumuladas en una forma diferente al arreglo normal que muestran cuando se encuentran en la SN, lo que indicó que muy probablemente se trataba de neuronas trasplantadas. En todos los demás cerebros analizados no se encontró el trasplante y sólo en algunos casos la cicatriz que se forma alrededor de la aguja, lo que pudiera haber ayudado a localización del trasplante.

Aunque existen reportes de que células trasplantadas en ratas neonatas sobreviven hasta la edad adulta [Nikkah, *et al.*, 1995], en el presente trabajo es posible que las células trasplantadas estuvieran muriendo. Con la finalidad de ver si las células sobrevivían a través del tiempo, se sacrificaron las ratas trasplantadas a diferentes tiempos: unas inmediatamente después de la cirugía (6 días pn) para confirmar que efectivamente las células estaban siendo inyectadas y otras a los días 14, 21 y 28 pn.

Dada la dificultad de diferenciar las células trasplantadas de las endógenas en los animales no lesionados, las células trasplantadas se marcaron previamente con Hoechst y también se usaron células que expresaban GFP. El depósito de las células se realizó de manera correcta, ya que se observaron claramente las células trasplantadas marcadas con Hoechst en las ratas sacrificadas inmediatamente después de la inyección. Al analizar los cerebros de las ratas al día 14 pn, se observó una disminución en el número de células TH+ marcadas con Hoechst, lo cual es correspondiente a lo antes reportado (Marion, *et al.*, 1990) pues al trasplantarse células no sobrevive el 100% de éstas. Sin embargo, se observó que conforme avanzaba el tiempo de trasplante el número de neuronas TH+, la marca de Hoechst y la cicatriz que deja el tracto de la aguja seguía disminuyendo, lo cual puede explicar el por qué, en la mayoría de los casos, al día 33 pn ya no se encontraban células del trasplante, ni cicatriz glial. Lo anterior confirma la incapacidad de las células trasplantadas de sobrevivir en el tejido hospedero y la gran plasticidad y capacidad de reparación del cerebro neonato.

La pregunta ahora es ¿Por qué se mueren las neuronas trasplantadas si hay reportes que observan sobrevivencia de las neuronas trasplantadas hasta la edad adulta? Una posible respuesta es que los trasplantes de los que se habla, son de neuronas provenientes del mesencéfalo ventral de rata inyectadas en rata, por lo que no existe rechazo inmunológico. Las neuronas que se trasplantaron en este trabajo son provenientes de células ES de ratón y se trasplantan en rata, por lo que la muerte de las células trasplantadas pudiera estar relacionada con un rechazo inmunológico. Las ratas utilizadas no se inmunosuprimieron, ya que el sistema inmunológico de la rata neonata es inmaduro. Este sistema empieza a madurar a partir del día 12 pn. En un estudio en el que se trasplantaron células de ratón en rata, se observa que a pesar de la inmadurez del sistema inmune de la rata, las células trasplantadas empiezan a morir a partir del día 30 pn, existiendo una disminución considerable de éstas (Marion, *et al.*, 1990). Sin embargo, en nuestro trabajo las ratas se sacrificaron al día 33pn, tiempo al cual se deberían de ver todavía una cantidad considerable de neuronas trasplantadas.

La baja sobrevivencia de estas células en el cerebro hospedero, pudiera también estar influenciado por las astrogliosis presenta a causa de la lesión, que por una parte pudiera liberar factores tróficos que ayudasen a la sobrevivencia de las células

endógenas y, por otra parte, pudiera acelerar la reacción inmune (Tedeschi, *et al.*; 1986; Kolb y Kolb-Bachofen, 1992; Nomura y Kitamura, 1993) y la muerte de las neuronas exógenas (Venters, *et al.*, 2000; Viviani y Marinovich, 1998; Viviani, *et al.*, 1998, 2000). Otra posible causa es que la viabilidad de estas células disminuya considerablemente debido al marcaje con Hoechst que se incorpora al núcleo, pudiendo éste estar afectando de manera importante la sobrevivencia de las células, ya que existen reportes que Hoechst 33342 induce muerte celular por apoptosis en hepatomas y miocitos (Zhang, *et al.*, 1999, 2000; Zhang y Kiechle, 1998, 2001). Además, existen reportes en donde se muestra que la proteína verde fluorescente puede causar alteraciones en la viabilidad, desarrollo o fisiología de las células que fueron transfectadas con esta proteína (Detrait, *et al.*, 2002; Hanazono, *et al.*, 1997, 2002; Liu, *et al.*, 1999) por lo que la desaparición de neuronas trasplantadas a través del tiempo pudiera deberse a muerte neuronal provocada, además de por el Hoechst, por la GFP presente.

### **6.3. CONCLUSIÓN**

Las neuronas DAs diferenciadas a partir de células troncales trasplantadas al día 6 pn en la sustancia nigra de ratas, no pueden extender sus axones e inervar el estriado, ya que no sobreviven en el tejido hospedero por más de 33 días.

## VII. REFERENCIAS

- Abrous DN, Rivet JM, Le Moal M, Herman JP. 1990. Similar post-lesion receptor readjustments following the unilateral 6-hydroxydopamine lesion of the dopaminergic mesotelencephalic system in neonatal and adult rats. *Brain Res.* 526:195-202.
- Archer T, Danysz W, Fredriksson A, Jonsson G, Luthman J, Sundström E, Teiling A. 1988. Neonatal 6-hydroxydopamine-induced dopamine depletions: motor activity and performance in maze learning. *Pharmacol Biochem Behav.* 31:357-64.
- Avale ME, Nemirovsky SI, Raisman-Vozari R, Rubinstein M. 2004. Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine. *J Neurosci Res.* 78:289-296.
- Ben-Shachar D, Youdim MB. 1991. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats. *J Neurochem.* 57:2133-2135.
- Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH. 1983. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Stand.* 522:9-18.
- Björklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinsonian rat model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:2344-2349.
- Bruno JP, Zigmond MJ, Stricker EM. 1986. Rats given dopamine-depleting brain lesions as neonates do not respond to acute homeostatic imbalances as adults. *Behav Neurosci.* 100:125-8.
- Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S. 1989. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res.* 476:10-15.
- Carlson BM. 2000. Segmentación e implantación. En: *Embriología humana y biología del desarrollo*. Carlson BM. Ed. Harcourt. Colombia. pp. 40-54.
- Carlsson A, Falck B, Hillarp NA. 1962. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol. Scand Suppl.* 56:1-28.
- Chambers I, Smith A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* 23:7150-7160.

- Chen LW, Yung KL, Chan YS. 2005. Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. *Curr Drug Targets*. 6:821-833.
- Cunningham MG, McKay RD. 1993. A hypothermic miniaturized stereotaxic instrument for surgery in newborn rats. *J Neurosci Methods*. 47:105-14.
- Dahlström A, Fuxe K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*. 232:1-55.
- Davids E, Zhang K, Kula NS, Tarazi FI, Baldessarini RJ. 2002. Effects of norepinephrine and serotonin transporter inhibitors on hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesioning in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 301:1097-1102.
- Detrait ER, Bowers WJ, Halterman MW, Giuliano RE, Bennice L, Federoff HJ, Richfield EK. 2002. Reporter gene transfer induces apoptosis in primary cortical neurons. *Mol Ther*. 5:723-30.
- Dianne MA, Van den Heuvel R, Pasterkamp J. 2008. Getting connected in the dopamine system. *Prog Neurobiol*. 85:75-93.
- Donovan PJ, Gearhart J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nat*. 414:92-97.
- Duncan GE, Criswell HE, McCown TJ, Paul IA, Mueller RA, Breese GR. 1987. Behavioral and neurochemical responses to haloperidol and SCH-23390 in rats treated neonatally or as adults with 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 243:1027-1034.
- Gates MA, Coupe VM, Torres EM, Fricker-Gates RA, Dunnett SB. 2004. Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur J Neurosci*. 19:831-844.
- Gee P, Davison AJ. 1989. Intermediates in the aerobic autoxidation of 6-hydroxydopamine: relative importance under different reaction conditions. *Free Radic Biol Med*. 6:271-84.
- Gilbert SF. 2003. The central nervous system and the epidermis. En: *Developmental Biology*. Gilbert SF. Ed. Sinauer Associates. Inc. Estados Unidos. pp. 391-427
- Glinka YY, Youdim MB. 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol*. 292:329-332.
- Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. 1996. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem*. 66:2004-2010.
- Glinka Y, Gassen M, Youdim MB. 1997. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl*. 50:55-66.
- Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. 1998. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur J Pharmacol*. 351:121-129.

Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol.* 14:644-653.

Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, Emmons RV. 1997. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Hum Gene Ther.* 8:1313-1319.

Hanazono Y, Terao K, Shibata H, Nagashima T, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Kato I, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K. 2002. Introduction of the green fluorescent protein gene into hematopoietic stem cells results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells in nonhuman primates. *J Gene Med.* 5:470-477.

Hedlund E, Pruszek J, Lardaro T, Ludwig W, Viñuela A, Kim KS, Isacson O. 2008. Embryonic stem cell-derived Pitx3-enhanced green fluorescent protein midbrain dopamine neurons survive enrichment by fluorescence-activated cell sorting and function in an animal model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* 26:1526-36.

Heikkilä R, Cohen G. 1972. Further studies on the generation of hydrogen peroxide by 6-hydroxydopamine. Potentiation by ascorbic acid. *Mol Pharmacol.* 8:241-248.

Hokfelt T, Martensson R, Björklund A, Goldstein M, 1984. Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy (Classical Transmitters in the CNS, Part I)*. Björklund A, Hokfelt T. Ed. Elsevier. Amsterdam, pp.409-440.

Jonsson G, Sachs C. 1970. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur J Pharmacol.* 9:141-155.

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron.* 28:31-40.

Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nat.* 418:50-56.

Kirschstein R y Skirboll R. 2001. *Stem Cells Progress and Future Research Directions*. National Institute of Health.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. 1992. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today.* 13:157-160.

Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. 1995. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 64:1703-1707. Erratum in: *J Neurochem.* 65:1906:1916.



- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 18:675-679.
- Ljungdahl A, Hökfelt T, Jonsson G, Sachs C. 1971. Autoradiographic demonstration of uptake and accumulation of 3H-6-hydroxydopamine in adrenergic nerves. *Experientia.* 27:297-299.
- Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M. 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 49:407-417.
- Lindvall O, Björklund A. 2004. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx.* 1:382-393.
- Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. 1999. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 260:712-717.
- Luthman J, Lindqvist E, Young D, Cowburn R. 1990. Neonatal dopamine lesion in the rat results in enhanced adenylate cyclase activity without altering dopamine receptor binding or dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein (DARPP-32) immunoreactivity. *Exp Brain Res.* 83:85-95.
- Marion DW, Pollack IF, Lund RD. 1990. Patterns of immune rejection of mouse neocortex transplanted into neonatal rat brain, and effects of host immunosuppression. *Brain Res.* 519:133-143.
- Mennicken F, Savasta M, Chritin M, Feuerstein C, Le Moal M, Herman JP y Abrous DN. 1995. The neonatal lesion of the meso.telencephalon dopaminergic pathway increases intrastriatal D2 receptor levels and synthesis and this effect is reversed by neonatal dopaminergic rich-graft. *Brain Res Mol Brain Res.* 28:211-221.
- Miller FE, Heffner TG, Kotake C, Seiden LS. 1981. Magnitude and duration of hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine is related to the extent of brain dopamine depletion. *Brain Res.* 229:123-32.
- Moy SS, Knapp DJ, Breese GR. 2001. Effect of olanzapine on functional responses from sensitized D1-dopamine receptors in rats with neonatal dopamine loss. *Neuropsychopharmacology.* 25:224-33.
- Mujtaba T, Piper DR, Kalyani A, Groves AK, Lucero MT, Rao MS. 1999. Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES Cells. *Dev Biol.* 214:113-127.
- Nakamura H, Watanabe Y. 2005. Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int J Dev Biol.* 49: 231-235.
- Nappi AJ, Vass E. 1994. The effects of glutathione and ascorbic acid on the oxidations of 6-hydroxydopa and 6-hydroxydopamine. *Biochim Biophys Acta.* 1201:498-504.

Nikkhah G, Cunningham MG, Jodicke A, Knappe U, Bjorklund A. 1994a. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 633:133-143.

Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A. 1994b. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci.* 14:3449-3461.

Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD, Björklund A. 1995a. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci.* 15:3548-3561.

Nikkhah G, Cunningham MG, McKay R, Björklund A. 1995b. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery. *J Neurosci.* 15:3562-3570.

Nomura Y, Kitamura Y. 1993. Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci Res.* 18:103-107.

Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 54:403-414.

Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. 2007. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development.* 134:2881-2887.

Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L. 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 24:12543-12548.

Pituello F. 1997. Neuronal specification: generating diversity in the spinal cord. *Curr Biol.* 7:R701-R704.

Puelles L y Rubenstein JL. 1993. Expression patterns and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16:472-479.

Rodriguez-Gomez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow JS, Musachio JL, Chin FT, Toyama H, Seidel J, Green MV, Thanos PK, Ichise M, Pike VW, Innis RB, McKay RD. 2007. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells.* 25:918-928.

Roginsky VA, Barsukova TK, Bruchelt G, Stegmann HB. 1997. Iron bound to ferritin catalyzes ascorbate oxidation: effects of chelating agents. *Biochim Biophys Acta.* 1335:33-39.

Schnell L, Schwab ME. 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature.* 343:269-272.

- Shaywitz BA, Yager RD, Klopper JH. 1976. Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science*. 191:305-308.
- Shim JW, Park CH, Bae YC, Bae JY, Chung S, Chang MY, Koh HC, Lee HS, Hwang SJ, Lee KH, Lee YS, Choi CY, Lee SH. 2007. Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurr 1 overexpression. *Stem Cells*. 25:1252-62.
- Schwab ME. 1990. Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci*. 13:452-456.
- Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE. 1993. Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci*. 16:565-595.
- Shaywitz BA, Yager RD, Klopper JH. 1976 Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science*. 191:305-308.
- Smidt MP, Burbach JPH. 2007. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Neurosci*. 8:21-32.
- Smits SM, Burbach JP, Smidt MP. 2006. Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Prog Neurobiol*. 78:1 – 16.
- Snyder AM, Zigmond MJ, Lund RD. 1996. Sprouting of serotonergic afferents into striatum after dopamine-depleting lesions in infant rats: a retrograde transport and immunocytochemical study. *J Comp Neurol*. 245:274-81.
- Steensen N. 2000. Tejido nervioso En: *Histología*. Genesser S, Ed. Médica Panamericana. Argentina, pp. 327-376
- Studer L, Tabar V, McKay RD. 1998. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci*. 1:290-295.
- Svendsen CN, Langston JW. 2004. Stem cells for Parkinson disease and ALS: replacement or protection? *Nat Med*. 10:224-225
- Tedeschi B, Barrett JN, Keane RW. 1996. Astrocytes produce interferon that enhances the expression of H-2 antigens on a subpopulation of brain cells. *J Cell Biol*. 102:2244-2253.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145–1147.
- Ungerstedt U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 5:107-110.
- Venters HD, Dantzer R, Kelley KW. 2000. Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 917:210-20.

- Vernay B, Koch M, Vaccarino F, Briscoe J, Simeone A, Kageyama R, Ang SL. 2005. Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *Ann N Y Acad Sci.* 25:4856-4867.
- Viviani B, Corsini E, Galli CL, Marinovich M. 1998. Glia increase degeneration of hippocampal neurons through release of tumor necrosis factor-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol.* 150:271-276.
- Viviani B, Corsini E, Galli CL, Padovani A, Ciusani E, Marinovich M. 2000. Dying neural cells activate glia through the release of a protease product. *Glia.* 32:84-90.
- Zhang X, Kiechle FL. 1998 Hoechst 33342 induces apoptosis and alters tata box binding protein/DNA complexes in nuclei from BC3H-1 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 248:18-21.
- Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ. 2001. Role of dopamine D(4) receptors in motor hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesions in rats. *Neuropsychopharmacology.* 25:624-632.
- Zhang X, Chen J, Davis B, Kiechle F. 1999. Hoechst 33342 induces apoptosis in HL-60 cells and inhibits topoisomerase I in vivo. *Arch Pathol Lab Med.* 123:921-927.
- Zhang T, Cao EH, Li JF. 2000. A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular Ca<sup>2+</sup> and apoptosis using Fluo-3 and Hoechst 33342. *Anal Quant Cytol Histol.* 22:93-97.
- Zhang X, Kiechle F. 2001 Hoechst 33342-induced apoptosis is associated with decreased immunoreactive topoisomerase I and topoisomerase I-DNA complex formation. *Ann Clin Lab Sci.* 31:187-98.