



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DIVISIÓN DE  
NEUROCIENCIAS DEPARTAMENTO DE NEUROPATOLOGÍA  
MOLECULAR

“EVALUACIÓN DEL TRASPLANTE DE CUERPOS EMBRIOIDES EN  
UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

C O L L A Z O N A V A R R E T E O M A R

Director de Tesis: Dr. René Drucker Colín  
Co-tutora: Dra. Magdalena Guerra Crespo

Tlalnepantla, Estado de México.  
Noviembre, 2011.





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

ESTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO AL-201 DE LA DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA TUTORÍA DEL DR. RENÉ DRUCKER COLÍN Y LA DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO.

Y CON EL APOYO ECONÓMICO DE:

**DGAPA-PAPIIT**

BECA OTORGADA A COLLAZO-NAVARRETE, O. PARA CONCLUSIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN IN225509 OTORGADO AL DR. RENÉ DRUCKER COLÍN.

**DGAPA-IACOD**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN I1201911 OTORGADO A LA DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO.

**FIDEICOMISO-UNAM**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN OTORGADO AL DR. RENÉ DRUCKER COLÍN.

**IMPULSA-UNAM**

BECA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN OTORGADA A COLLAZO-NAVARRETE, O.

PROYECTO IMPULSA 02 OTORGADO AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CÉLULAS TRONCALES.

Y HA SIDO DISTINGUIDO COMO:

MEJOR TRABAJO DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA EN EL CERTAMEN DE INVESTIGACIÓN ESTUDIANTIL EN EL MARCO DEL "XXIX COLOQUIO DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA", UNAM 2010.

PRIMER LUGAR EN EL PRIMER CONCURSO DE FOTOGRAFÍA CIENTÍFICA DE MICROSCOPIO "LA CIENCIA Y EL ARTE" DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM 2010.

**Dedico esta tesis a Hanna Collazo, Arael Collazo, Prisci, Yoyis, Edson y Josué  
esperando que en el futuro les sirva como inspiración.**

***“EL PODER RESIDE EN EL TIPO DE CONOCIMIENTO QUE UNO POSEE. ¿QUÉ SENTIDO TIENE  
CONOCER COSAS INÚTILES?, ESO NO NOS PREPARA PARA NUESTRO INEVITABLE ENCUENTRO  
CON LO DESCONOCIDO”***

## Agradecimientos

Tal vez sean poco necesarias las palabras para demostrar mi más profundo agradecimiento a las personas que han hecho posible la historia de mi vida, que por poco o mucho compartieron y comparten sus vidas conmigo, al mismo tiempo que vuelven de la mía algo realmente maravilloso y placentero.

Agradezco a mis padres, Georgina Navarrete y Javier Collazo, quienes me dieron la vida y me han servido desde siempre como inagotable fuente de inspiración y de ánimos. Agradezco a mi tía Andrea, la mujer que amparó mi futuro, la misma que dedicó su vida para permitirme crecer y por la cual nunca me faltó nada. Agradezco aun más a mis abuelitos que desde niño me enseñaron lo que vale el cariño profundo y verdadero, los que compartieron y me enseñaron las cosas buenas de la vida. Por ser mis compañeros y amigos, agradezco a mis hermanos Chris y Alan, porque con ellos he de estar toda mi vida.

Agradezco de la misma forma por su incondicional apoyo y por siempre estar ahí a mis tíos Car, Rodri, Rafa, Chucho y Tomás a mis tías Eva, Lore y Sove.

A ti Sharon por ser el amor de la mitad de mi vida y llenar de magia mi futuro. Por mostrarme que la vida tiene sentido y que en ella no existen cosas malas, solo malas perspectivas. Por creer en mí e inspirar cada uno de mis pasos. Nadie nunca te reemplaza.

A Paris y Fernando, que sin conocerme o conociéndome realmente muy poco me extendieron su incondicional ayuda e hicieron posible el primer paso en este cometido.

Agradezco al doctor René Drucker, por brindarme un espacio en su laboratorio y permitir concluir mi formación profesional.

Agradezco a la doctora Magdalena Guerra Crespo por su dedicación y paciencia en la realización de esta tesis.

Agradezco a Marcela Palomero Rivero y Diana Millán Aldaco el apoyo técnico que permitió la realización de este proyecto. Gracias, además, por todos sus invaluable consejos y gran amistad.

También Agradezco todo el apoyo y cariño de Tere Torres, María Valverde y al Sr. Lino. Gracias también a todos mis compañeros en el laboratorio, en especial a Rubén García y a Guadalupe Maya.

Este trabajo también fue posible gracias a la ayuda y asesoría técnica de: Francisco Pérez Eugenio (Unidad de cómputo del IFC), Gabriel Orozco Hoyuela (Unidad de microscopía del IFC) y Andrés Saralegui Amaro (Encargado de la Unidad de Microscopía Confocal IBT).

**ABREVIATURAS**  
(Por orden de aparición)

EP	Enfermedad de Parkinson
SNc	<i>Sustancia Nigra Pars Compacta</i>
PET	<i>"Positron emission tomography"</i> . Tomografía por emisión de positrones
F-DOPA	Fluorodopa
MAO	Monoamina-Oxidasa
GB	Ganglios basales
FOG	<i>"Freezing of gait"</i> . Congelamiento de la marcha
EPD	EP-Demencial
GPi	<i>Globus Palidus</i> interno
SNr	<i>Sustancia Nigra Pars Reticulata</i>
GPe	<i>Globus Palidus Pars</i> externo
STN	<i>"Sub thalamic Nucleus"</i> . Núcleo sub-talámico
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina
MPP <sup>+</sup>	Ion 1-metil-4-fenilpridinio
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ROS	<i>"Reactive oxygen species"</i> . Especies reactivas de oxígeno
DAT	<i>"Dopaminergic transporter"</i> . Transportador dopaminérgico
NAT	<i>"Noradrenergic transporter"</i> . Transportador noradrenérgico
DMI	Desmetilipramine
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
COMT	Catecol-O-Metiltransferasa
CET	Cirugía estereotáxica
MA	Médula adrenal

NGF	<i>"Neural growth factor"</i> . Factor de crecimiento neural
NGS	Neuronas ganglionares simpáticas
CC	Cuerpo carotideo
RPE	<i>"Retinal pigmentary epithelium"</i> . Epitelio pigmentario de la retina
MV	Mesencéfalo ventral
GID	<i>"Graft induced dyskinesias"</i> . Discinencias inducidas por el trasplante
TH	Tirosina hidroxilasa
NPC	<i>"Neural precursor cell"</i> . Precursores neurales
MSC	<i>"Mesenchymal stem cell"</i> . Célula troncal mesenquimal
iPS	<i>"Induced pluripotent stem cells"</i> . Células troncales pluripotentes inducidas
CTE	Células troncales embrionarias
CEs	Cuerpos embrioides
LIF	<i>"Leukemia inhibitory factor"</i> . Factor inhibidor de leucemia
MEF	<i>"Mouse embryonic fibroblast"</i> . Fibroblastos embrionarios de ratón
AFP	Alfafetoproteína
NES	Nestina
DCX	Doblecortina
GFP	<i>"Green fluorescent protein"</i> . Proteína verde fluorescente

## Contenido

	Pág.
<b>1. Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Enfermedades Neurodegenerativas</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Enfermedad de Parkinson</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.1 Historia</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.2 Etiología y Patogénesis</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.3 Síntomas Clínicos</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.4 Etiopatología y Ganglios Basales</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Modelos Experimentales de la Enfermedad de Parkinson</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.1 1-Metil-4-Fenil-1, 2, 3, 6-Tetrahidropiridina (MPTP)</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.2 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4 Tratamientos Farmacológicos</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.1 L-Dihidroxitifenilalanina (L-DOPA)</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4.2 Agonistas Dopaminérgicos</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4.3 Otros Fármacos</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Tratamientos Quirúrgicos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5.1 Palidotomía</b> .....	<b>23</b>
<b>1.5.2 Estimulación del Glóbulo Pálido Interno (GPi)</b> .....	<b>23</b>
<b>1.6 Terapia de Reemplazo Celular</b> .....	<b>23</b>
<b>1.6.1 Trasplantes Autólogos (auto injertos)</b> .....	<b>24</b>
<b>1.6.1.1 Médula Adrenal</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6.1.2 Neuronas Ganglionares Simpáticas</b> .....	<b>26</b>
<b>1.6.1.3 Cuerpos Carotideos</b> .....	<b>26</b>
<b>1.6.2 Trasplantes Alogénicos</b> .....	<b>27</b>

1.6.2.1 Spheramine <sup>TM</sup> .....	27
1.6.2.2 Mesencéfalo Ventral de Embrión .....	27
1.6.3 Xenotrasplantes .....	29
1.6.3.1 Tejido Porcino .....	29
1.6.4 Trasplante de Células Troncales .....	30
1.6.4.1 Precusores Neurales .....	31
1.6.4.2 Células Troncales Mesenquimales .....	32
1.6.4.3 Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPS) .....	32
1.6.4.4 Células Troncales Embrionarias .....	33
1.7 Cuerpos Embrioides .....	34
2. Antecedentes .....	37
3. Justificación .....	38
4. Hipótesis .....	39
5. Objetivos .....	39
5.1 General .....	39
5.2 Particulares .....	39
6. Materiales y Método .....	40
6.1 Animales .....	40
6.2 Lesión y Prueba de Giro .....	40
6.3 Formación de Cuerpos Embrioides .....	41
6.4 Preparación de cuerpos embrioides para trasplante .....	42
6.5 Trasplante de Cuerpos Embrioides .....	42
6.6 Controles .....	42
6.7 Perfusión Intracardiaca .....	42

6.8 Análisis Histológico .....	43
6.9 Conteo .....	43
7. Resultados .....	44
7.1 Lesión .....	44
7.2 Evaluación del Trasplante de Cuerpos Embrioides .....	46
7.2.1 Localización .....	46
7.2.2 Supervivencia .....	46
7.2.3 Diferenciación .....	47
7.3 Controles .....	50
8. Discusión .....	52
9. Conclusiones .....	57
10. Referencias .....	58

## Introducción

### Enfermedades Neurodegenerativas

El sistema nervioso central como periférico, al igual que el resto del organismo, sufre desgastes fisiológicos normales como afectaciones inadvertidas del medio externo, de la misma forma puede sufrir daños causados de manera indirecta por mutaciones genéticas o desórdenes metabólicos. Los padecimientos del sistema nervioso están mediados por la degeneración neuronal. Por tanto, se les conoce de manera general como enfermedades neurodegenerativas (Connor y Dragunow, 1998). Éstas afectan de manera mayoritaria a la población adulta entre los 65 y 80 años de edad y las más estudiadas son las de Alzheimer, Huntington y Parkinson (Mathisen, 2003).

Aunque estas enfermedades han sido descritas desde hace mucho tiempo, el conocimiento que se tiene sobre la etiología de la mayoría de los padecimientos neurodegenerativos es escaso. Por lo anterior es aun imposible prevenirlas o frenarlas desde etapas tempranas.

### Enfermedad de Parkinson

#### Historia

Uno de los padecimientos neurodegenerativos con mayor incidencia a nivel mundial es la enfermedad de Parkinson (EP). Ésta enfermedad fue descrita en el año de 1817 por el médico, fisiólogo y neurólogo inglés James Parkinson en un tratado que llevó por nombre “la parálisis agitante”, en él describe a la EP como un padecimiento caracterizado por movimientos involuntarios, con pérdida de fuerza y aumento en la rigidez muscular, dificultad para caminar, además de daño a los sentidos e intelecto (Parkinson, 2002). La descripción de James Parkinson llevó en los siguientes años a la validación clínica de la EP, desde entonces el conocimiento sobre la patología y el espectro clínico se ha desarrollado enormemente. Más tarde, en el año de 1912 Friedrich Heinrich Lewy describió los cuerpos de inclusión, estructuras eosinofílicas en el citoplasma de las neuronas, que llevan su nombre (Cuerpos de Lewy) y que en la actualidad son considerados como marcas específicas de la EP, sin embargo, también se han encontrado en el cerebro de pacientes ancianos que nunca desarrollaron alguna sintomatología. Más adelante, Tretiakoff reportó pérdida de células pigmentadas en la *Sustancia Nigra Pars Compacta* (SNc) en pacientes con EP (Kapp, 1992). En la década de 1950, Carlsson observó que el 80% de dopamina

en el cerebro se localiza en los ganglios basales (Carlsson, 1959). Él descubrió la relación entre la pérdida de dopamina y la EP. La teoría de la pérdida de dopamina fue confirmada por estudios bioquímicos *post-mortem*, demostrando niveles bajos de dopamina y sus metabolitos en el núcleo caudado, putámen, núcleo acumbens, SNc y globo pálido, estructuras también conocidas como ganglios basales (GB) (Hornykiewicz, 2006). Posteriormente, estudios de tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography*: PET) demostraron deterioro en la absorción de [18F]-fluorodopa (F-DOPA) en el estriado de pacientes con EP, reflejando el defecto presináptico dopaminérgico en la EP (Leenders et al., 1986). Sin embargo, además del déficit dopaminérgico, la EP es ahora conocida como un padecimiento neurodegenerativo multicéntrico.

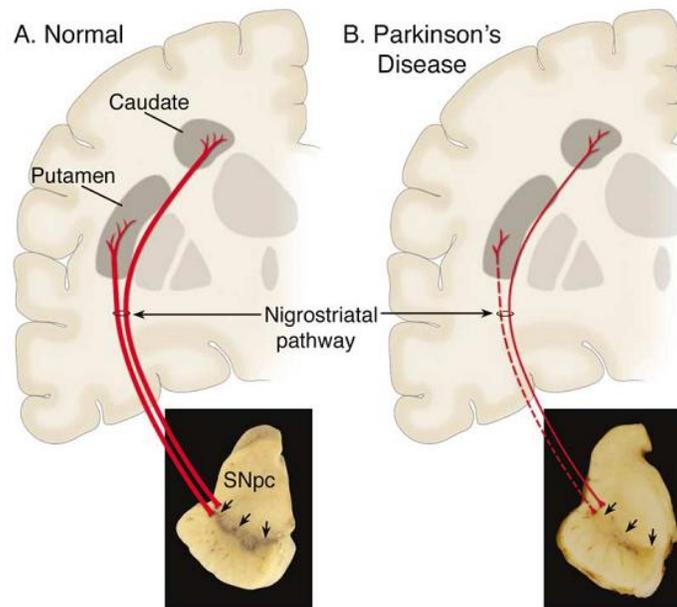
### **Etiología y Patogénesis**

La prevalencia de la EP va de 1 a 2 habitantes por cada 1000. Sin embargo, del 1 al 2 por ciento de la población adulta mayor es afectada y el porcentaje aumenta alrededor del 3% en las personas mayores a los 80 años (Tanner y Goldman, 1996; de Lau y Breteler, 2006). La mayoría de los casos de la EP son esporádicos y se les conoce como EP idiopática. Sin embargo, los parientes de primer grado tienen un riesgo elevado de desarrollar la EP (Gasser, 1998). Se han identificado solo un pequeño grupo de genes implicados en la EP causantes de la EP familiar. No obstante, trabajos realizados en gemelos monocigotos y dicigotos relacionados con la EP revelaron que la herencia no es un componente etiológico importante en la mayoría de los casos de la enfermedad (Tanner et al., 1999). En la actualidad, no se conocen los mecanismos precisos que desencadenan el proceso neurodegenerativo en la EP, aunque se han propuesto varios factores posibles como toxinas exógenas, procesos inflamatorios, mutaciones genéticas y combinaciones de éstos. La hipótesis que es aceptada de manera general es la que propone que la EP es el resultado de la interacción entre componentes genéticos y ambientales. De acuerdo con esta teoría, la interacción de una predisposición genética y algún tipo de factor ambiental induce una falla en el proceso de respiración mitocondrial y estrés oxidativo dentro de las neuronas dopaminérgicas de la SNc seguida de la muerte celular (Schapira et al., 1992).

Otra teoría, la hipótesis de la oxidación, sugiere que los pacientes con EP tienen una deficiencia en el sistema antioxidante. El metabolismo oxidativo de la dopamina mediado por la enzima monoamina-oxidasa (MAO) es seguido por la formación de peróxido, el cual normalmente es degradado por el glutatión. Como los niveles de glutatión se encuentran disminuidos en la SNc de los pacientes con EP, es posible que se estén generando más radicales libres con capacidades tóxicas, mismos que intervienen en la muerte de las células dopaminérgicas (Jenner y Olanow, 1996).

## Síntomas Clínicos

La degeneración progresiva del sistema nigro-estriatal causa denervación dopaminérgica del estriado [Fig. 1]. Cuando los síntomas clínicos aparecen, la recepción de dopamina en el estriado ya se ha reducido al menos 35%. La relación entre el sistema nigro-estriatal dopaminérgico y los niveles de dopamina estriatal endógena, la cual es más gravemente empobrecida en la EP sintomática, todavía no está totalmente dilucidada.



**Figura 1 Neuropatología de la enfermedad de Parkinson. (A)** Representación esquemática de la condición normal de la vía nigro-estriatal (en rojo). Ésta compuesta por neuronas dopaminérgicas de las cuales sus cuerpos celulares se encuentran en la SNc (SNc indicada con flechas). Estas neuronas proyectan hacia los ganglios basales en el estriado (caudado y putámen). La fotografía muestra la pigmentación normal de la SNc producida por la neuromelalina dentro de las células dopaminérgicas. **(B)** Representación esquemática de la vía nigro-estriatal degenerada (en rojo). Hay una marcada pérdida de células dopaminérgicas que proyectan hacia el estriado. La fotografía muestra despigmentación de la zona por la degeneración celular (Dauer y Przedborski, 2003).

En la EP se distinguen 3 síntomas cardinales que son lentitud anormal del movimiento (bradicinesia), rigidez y temblor involuntario. La presencia de dos de tres de los síntomas primarios y la respuesta consistente a una adecuada dosis de L-DOPA son considerados, para la mayoría de los expertos, como esenciales para el diagnóstico de la EP.

El temblor, definido como movimientos oscilatorios entre los músculos antagonistas y agonistas, está presente en la EP, de manera más común cuando el paciente está en reposo. Éste es más pronunciado en las porciones distales de los miembros corporales, en casos más avanzados de la enfermedad, el temblor puede presentarse en labios, mandíbula y lengua. Posteriormente, el temblor involuntario disminuye y las bradicinesias son más progresivas. Algunas veces el término acinesia es usado como uno de los signos primarios de la enfermedad, la acinesia es la incapacidad de iniciar movimientos. Otro de los problemas encontrados en los pacientes con EP, son los relacionados con la ejecución de la marcha junto con la pérdida de los reflejos de equilibrio, que en conjunto, pueden derivar en una inmovilidad dramática y riesgos de caída. La marcha se caracteriza por inseguridad en la ejecución, pasos cortos, movimiento disminuido de los brazos y una postura flexionada hacia adelante. Por otro lado, en un número de entre el 30 y 60% de los pacientes sufren lo que se conoce como congelamiento de la marcha (*freezing of gait*: FOG) (Giladi et al., 1997; Lamberti et al., 1997). FOG es una alteración repentina, en la que los pacientes se sienten atrapados al piso con los pies “pegados al suelo”. FOG frecuentemente sucede en situaciones difíciles con incremento de “estrés mental” y a menudo se puede superar con “trucos” externos, por ejemplo con pistas visuales (Nieuwboer et al., 1997).

La demencia se desarrolla entre el 20 y 40% de los casos de EP (Bosboom et al., 2004), sin embargo, existen cambios cognitivos que acompañan a la enfermedad que no son clasificados principalmente como demencia. El patrón de estos déficits cognitivos en la EP usualmente incluye deterioro similar al observado en pacientes con lesiones lóbulo-frontales, así como deterioro de la memoria episódica, disfunción visual-espacial y afectaciones en la fluidez verbal (Williams-Gray et al., 2006). Sobre todo los problemas se identifican con tareas que dependen de la planificación del contexto; a este déficit se le ha llamado deterioro de la flexibilidad mental (Bowen, 1976). Pacientes con EP particularmente pueden tener dificultades para desarrollar y mantener un conjunto de planes útiles (Taylor et al., 1986a; Taylor et al., 1986b). En estados más avanzados los síntomas cognitivos pueden empeorar y la EP, en algunos casos, derivar en EP-demencial (EPD). Las alucinaciones pueden hacerse presentes y son a menudo asociadas con un deterioro cognitivo mayor (Williams-Gray et al., 2006). Los problemas del habla en la EP pueden estar relacionados con la afectación motora, resultando en hipofonía o disartria. Los problemas en el lenguaje también se han observado en la comprensión de frases (Grossman et al., 1992). Los déficits de procesamiento semántico en la EP han sido relacionados con la pérdida de dopamina en el estriado.

Adicionalmente en la EP se presentan síntomas no motores, que se pueden observar o identificar desde principios del desarrollo de la enfermedad. Estas observaciones clínicas de síntomas no motores llevó a un nuevo concepto neuropatológico de neurodegeneración en la EP, el cual empieza en áreas no dopaminérgicas, en particular en el sistema nervioso entérico y luego se eleva a través de la médula espinal y el tronco cerebral hacia las neuronas nigrales y

subsecuentemente a neuronas corticales (Braak et al., 2003; Przuntek et al., 2004). Los síntomas no motores involucran depresión, alteraciones en el sueño y alteración del olfato, entre otros (Chaudhuri, et al., 2005).

## **Etiopatología y Ganglios Basales**

La circuitería de los ganglios basales (GB) se encuentra interpuesta entre la corteza y el tálamo. Los GB se constituyen por 5 núcleos subcorticales: putámen, núcleo caudado, *Globus Palidus* (externo e interno), núcleo subtalámico y *sustancia nigra (compacta y reticulata)*. Los ganglios basales son conocidos por formar parte de la circuitería del cerebro anterior involucrado en la selección de los movimientos. Las alteraciones de los GB resultan una variedad de padecimientos relacionados con el movimiento que van desde las que se caracterizan por la hipocinesia como la enfermedad de Parkinson, hasta en las que se presenta la hipercinesia, como la corea. Además de su papel en el control motor, ellos están implicados en varios procesos cognitivos y funcionales. Brown y Marsden propusieron que los GB sirven para facilitar la coordinación de la función cortical que es la base de la selección de un movimiento apropiado o una secuencia apropiada de pensamientos (Brown y Marsden, 1998).

Una de las características del cuerpo estriado, el principal integrador de la información cortical y talámica que llega a los GB, es que éste tiene una fuerte innervación de dopamina que proviene del cerebro medio a través de la vía nigro-estriatal. Esta señal de entrada es crítica para el funcionamiento normal de los GB.

En el modelo clásico, los GB forman una red compleja de “lazos” paralelos que integran las regiones cerebrales corticales. Este circuito motor se encuentra en las áreas motoras corticales, las cuales proyectan hacia el estriado principalmente al putámen. Dentro de la descripción clásica del circuito de los ganglios basales se encuentra la “*Vía directa de los GB*”. Las neuronas en ésta vía tienen receptores dopaminérgicos D1 y co-expresan péptidos como sustancia P y Dinorfina. Esta vía provee un efecto inhibitorio (GABA-érgico) sobre neuronas del *globus palidus* interno/*Sustancia nigra reticulata* (GPI/SNr), por lo que se reduce el efecto inhibitorio de estos núcleos sobre el tálamo y por tanto “facilitan” el movimiento. Por otro lado, la “*Vía indirecta*” conecta el putámen, con el núcleo de salida vía *Globus palidus pars* externo (GPe) y el núcleo subtalámico (STN). Las neuronas de esta vía contienen receptores dopaminérgicos D2 y el péptido Encefalina. La estimulación de las neuronas de proyección estriatales conduce a la inhibición del GPe, desinhibición del STN y a la excitación del GPI/SNr, aumentando el efecto inhibitorio sobre el tálamo y “suprimiendo” los movimientos. Por lo tanto, esto sugiere que la función de freno-aceleración de los GB está basada al resultado neto de la oposición de las señales de efecto

inhibitorio de la vía directa y las señales de excitación de la vía indirecta. El modelo, o la concepción clásica de los GB propone, además, que la dopamina lleva a cabo un doble efecto sobre las neuronas estriatales: por un lado como excitador de los receptores D1 en la vía directa y por otro lado como inhibidor de los receptores D2 en la vía indirecta, facilitando así el movimiento (Gerfen et al., 1995; Gerfen y Surmeier, 2011).

De acuerdo con este “modelo clásico” de las vías directa/indirecta, una deficiencia en la dopamina derivaría en una reducida inhibición de la vía indirecta y reducida excitación de la vía directa, con el resultado neto de una excesiva activación de los núcleos de salida de los GB (GPi y SNr) e inhibición de los sistemas motores talamocorticales y del tronco cerebral, obviamente, lo anterior conduce a los síntomas motores de la EP. A pesar de que este modelo sirve como un buen punto de partida, no permite determinar la fisiopatología de las alteraciones motoras específicas en la EP. Diferentes aspectos de los síntomas motores y síntomas no motores no pueden ser explicados simplemente como el resultado del aumento de las salidas inhibitorias del circuito de los GB.

### **Modelos de la Enfermedad de Parkinson**

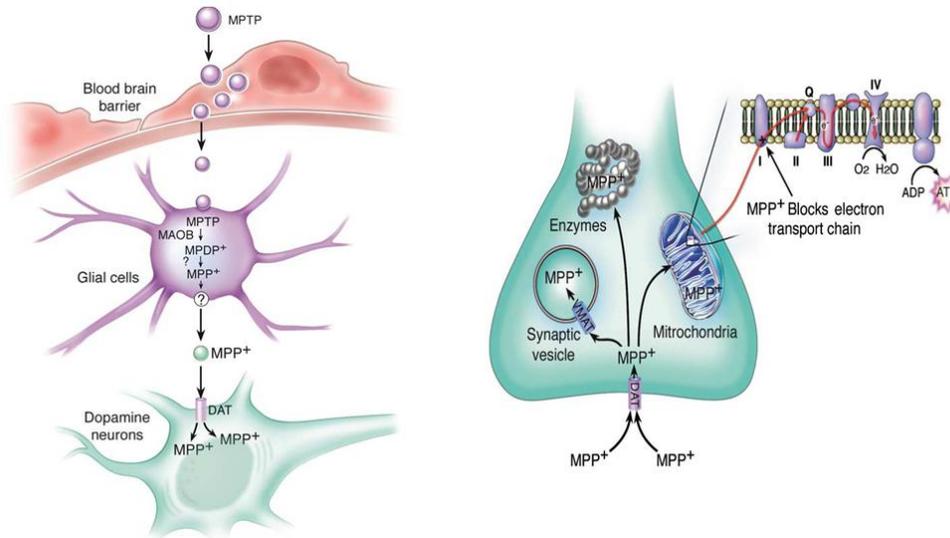
La mayoría del conocimiento que se tiene sobre la EP se ha generado en base a modelos animales. En estos modelos se usan neurotoxinas de alta especificidad o modificaciones genéticas. Los más comunes tratan de reproducir la pérdida de neuronas dopaminérgicas que se ha descrito como desencadenantes de los síntomas de la enfermedad, sin embargo existen los que reproducen distintas condiciones menos estudiadas de la EP como lo es la acumulación de los cuerpos de Lewy.

Los modelos animales más estudiados y utilizados son los generados por la inoculación de la toxina 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina y la 6-Hidroxdopamina.

#### **1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP)**

La capacidad del MPTP para inducir la EP fue descubierta por accidente en la década de los ochentas en un grupo de jóvenes adictos a un derivado fentanil sintético que generó un parkinsonismo irreversible (Davis, et al., 1997). El análisis de esta droga sintética indicó que contenía alrededor de 3% de MPTP. La identificación de esta toxina neuronal específica, ha sido reportada por producir virtualmente todos los cambios clásicos conductuales, cognitivos,

bioquímicos e histológicos que ocurren en la EP, tanto en humanos como en primates no humanos (Langston, et al., 1993; Davis, et al., 1997). En consecuencia, se ha considerado al MPTP como una poderosa droga que induce degeneración nigral en animales y ha sido usada para inducir síntomas tipo Parkinson en varias especies animales incluyendo roedores, perros, gatos y primates no humanos (Blum et al., 2001). Los efectos neurotóxicos del MPTP se deben a que esta molécula es altamente lipofílica y capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. El MPTP es bi-trasformado en los astrocitos por la enzima MAO-B dando lugar al metabolito activo el ion 1-metil-4-fenilpridinio ( $MPP^+$ ) (Kopin, 1992) [Fig. 2].



**Figura 2: Mecanismo hipotético de la toxicidad inducida por MPTP.** El MPTP es inyectado de manera periférica y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, es bi-trasformado en los astrocitos por la enzima MAO-B en el metabolito activo  $MPP^+$ . Este último atraviesa la membrana neuronal por un mecanismo de absorción específica. Dentro de las neuronas dopaminérgicas el  $MPP^+$  puede seguir una de tres rutas: Puede concentrarse dentro de la mitocondria a través de un proceso activo, interactuar con enzimas citosólicas o ser secuestrado en vesículas sinápticas por transportadores vesiculares de monoaminas, las dos primeras evidentemente tóxicas y la tercera con cierto carácter protector. Dentro de la mitocondria el  $MPP^+$  bloquea el complejo I. Con lo anterior se interrumpe la transferencia de electrones del complejo a la ubiquinona. Estas alteraciones promueven la producción de especies reactivas de oxígeno provocando disminución en los niveles de ATP, este decremento es responsable de una citotoxicidad secundaria inducida por un significativo y perjudicial aumento de los niveles de calcio citoplasmático. EL estrés oxidativo generado directamente por el  $MPP^+$  o indirectamente por el aumento de calcio, se traduce en una peroxidación macromolecular y por tanto conduce a la muerte celular (Dauer y Przedborski, 2003).

El  $MPP^+$  es una molécula polar que presenta una alta afinidad por el transportador de dopamina en la terminal sináptica de las neuronas dopaminérgicas. El  $MPP^+$  puede ser secuestrado por los transportadores vesiculares de monoaminas y almacenado dentro de las vesículas sinápticas,

además, es capaz de interactuar y ser acumulado por la neuromelalina, retrasando en ambos casos su efecto neurotóxico (Kopin, 1992). Finalmente el MPP<sup>+</sup> libre en el citoplasma entra en la mitocondria por un mecanismo dependiente de energía (Blum et al., 2001).

El potencial neurotóxico de MPP<sup>+</sup> se basa en su capacidad para inhibir al Complejo 1 de la cadena de transporte mitocondrial y dar lugar a sobreproducción de radicales libres (Buu, 1993). Por otra parte, también se han reportado alteraciones en el Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial y daño directo al DNA [Fig. 2].

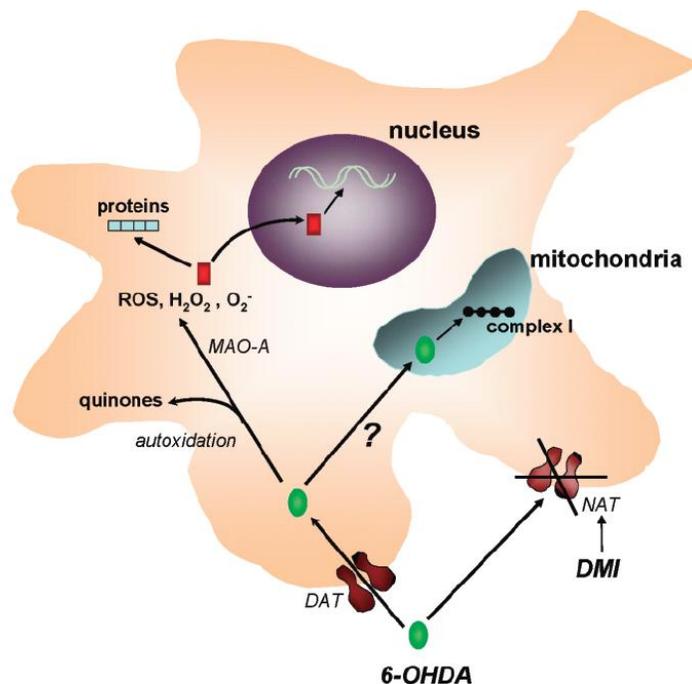
### **6-Hidroxidopamina (6-OHDA)**

Otra de las toxinas usadas para modelar la EP ha sido la 6-OHDA. Desde su primer descripción en 1959, esta neurotoxina ha jugado un papel fundamental en la investigación pre-clínica de la EP. Históricamente es la primera toxina usada para generar el modelo de la EP asociado a la muerte neuronal dopaminérgica de la SNc. Su toxicidad es relativamente selectiva para las neuronas dopaminérgicas, resultado de la recaptura preferencial de dopamina por de los transportadores dopaminérgicos (Luthman et al., 1989).

La 6-OHDA es una de las toxinas más utilizadas experimentalmente en modelos de degeneración de la vía nigro-estriatal *in vivo* y degeneración de células dopaminérgicas *in vitro*. La 6-OHDA es un análogo estructural de las catecolaminas: dopamina y noradrenalina, y tiene su efecto tóxico en neuronas catecolaminérgicas. El primer modelo en el que se exploró la neurotoxicidad de la 6-OHDA fue desarrollado en el año de 1968, experimento en el que se inyectó la toxina de forma bilateral en la SNc de rata, obteniendo así un modelo con anomalías motoras y un alto rango de mortalidad (Ungerstedt, 1968). Posteriormente la toxina fue inyectada en uno sólo de los hemisferios para generar el modelo 6-OHDA de rotación. Desde entonces la 6-OHDA se ha convertido en una de las toxinas más usadas para generar los modelos experimentales de la EP (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970).

La 6-OHDA es tóxica tanto a nivel periférico como central, sin embargo, al no tener la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica su efecto neurotóxico es posible sólo cuando se inyecta directamente en el tejido cerebral (Simola et al., 2007). Los efectos tóxicos de la 6-OHDA ocurren a través de un mecanismo de dos pasos, incluyendo la acumulación de la toxina en las neuronas catecolaminérgicas seguido de la alteración de la homeostasis celular y el daño neuronal. El almacenamiento intracelular de la neurotoxina está mediado por los transportadores

dopaminérgicos y noradrenérgicos encontrados en las membranas de las células catecolaminérgicas quienes reconocen e internalizan la toxina gracias a su parecido estructural con las catecolaminas endógenas (Simola et al., 2007). Cuando la toxina es colocada en el tejido cerebral ésta produce reactivos citotóxicos a través de mecanismos enzimáticos como no enzimáticos, los cuales son amplificados por trazas intracelulares de manganeso y hierro (Cadet y Brannock, 1998; Choi et al., 1999). Así, la oxidación de la toxina por la monoamina oxidasa (MAO-A) genera peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) el cual, además de ser altamente citotóxicos *per sé*, media la producción de radicales de oxígeno (Cohen, 1984). Por otra parte, la 6-OHDA experimenta una robusta auto-oxidación generando  $H_2O_2$  citotóxico, especies reactivas de oxígeno (ROS) y quinones catecolaminérgicas, los cuales atacan a los grupos nucleofílicos intracelulares (Padiglia et al., 1997). Incrementar los niveles de ROS y de otras especies reactivas por la inoculación de la 6-OHDA resulta en la depleción rápida de las enzimas antioxidantes intracelulares, lo anterior alternado con una neurotoxicidad amplificada causante de anomalías en la estructura celular y metabolismo que eventualmente resulta en un daño neuronal (Blum et al., 2001)[Fig. 3].



**Figura 3: Mecanismos de neurotoxicidad de la 6-OHDA.** Después de haber sido internalizada por los transportadores DAT, la 6-OHDA se almacena en las neuronas catecolaminérgicas. Dentro de las neuronas, la 6-OHDA sufre una conversión por la degradación enzimática de la MAO-A y por la auto-oxidación, generando varias especies citotóxicas que, al dañar las proteínas endocelulares y el núcleo, producen daño neuronal. Por otra parte, se ha visto que la 6-OHDA en modelos animales puede inducir neurotoxicidad afectando la actividad del complejo I mitocondrial. La neurotoxina se puede administrar en asociación con bloqueadores del transportador noradrenérgico (NAT), como DMI (Desmetilipramine), para evitar su absorción en células noradrenérgicas y orientar selectivamente su absorción por las neuronas dopaminérgicas (Simola et al., 2007).

## **Tratamientos**

### **Tratamientos farmacológicos**

La cura para la EP, como en muchos de otros padecimientos, se ha buscado en base a tratamientos farmacéuticos, éstos en algunos casos tienen un efecto positivo al reducir los síntomas manifestados en estas enfermedades, pero hasta ahora no hay medicamento que pueda detener los procesos neurodegenerativos y mucho menos revertir el daño o la pérdida celular, cabe mencionar que los tratamientos no son eficaces en todos los pacientes y en algunos casos, como en la enfermedad de Parkinson, generan con el paso del tiempo severos efectos secundarios ( Hely et al., 1994; Agid et al., 1999; Ahlskog, 2001).

### **L-DOPA**

El tratamiento farmacológico en la EP sigue siendo por excelencia la L-Dihidroifenilalanina o mejor conocida como L-DOPA o Levodopa por su nombre comercial. La L-DOPA es un precursor de la dopamina que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y depositarse en el tejido encefálico, lugar en el cual se convierte en sustrato de la DOPA descarboxilasa para así ser metabolizada a dopamina. Una de las complicaciones de la administración de L-DOPA es que ésta puede ser metabolizada antes de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que tiene que ir acompañada por inhibidores de las reacciones involucradas en su metabolismo, la primera reacción que tiene que ser inhibida es la conversión a dopamina, que se logra con inhibidores periféricos de la enzima descarboxilasa, la segunda conversión que puede tener a nivel periférico es a 3-O-Metil-dopa, que puede evitarse con la administración de inhibidores de la Catecol-O-Metiltransferasa (COMT). Estos fármacos inhibidores de la COMT a nivel periférico y a nivel central se administran junto con la L-DOPA, consiguiendo que los niveles en el plasma sean más estables y reduciendo la estimulación pulsátil de los receptores dopaminérgicos. Se ha comprobado que el uso de estos fármacos permite reducir la dosis de L-DOPA administrada continuamente. Sin embargo, estos medicamentos producen insuficiencia hepática aguda, además de diarrea constante y coloraciones anormales en la orina (Arpa y Vivancos, 2004).

La L-DOPA en conjunto con los inhibidores de las reacciones periféricas es la mejor opción efectiva para el control de los síntomas en la EP y la mayoría de los pacientes responden al tratamiento. Este fármaco mejora la discapacidad originada por la enfermedad y mantiene la independencia para las actividades normales del paciente. Sin embargo, la mayoría de los pacientes al cabo de 3 ó

5 años de tratamiento desarrollan severos síntomas secundarios, así como fluctuaciones en la actividad motora. Puede también provocar sedación, pesadillas durante el sueño y problemas neuro-psiquiátricos como alucinaciones, psicosis, manía e hipersexualidad. Además el tratamiento no ayuda a mejorar síntomas como la congelación o rigidez, inestabilidad de postura, disfunción autonómica y demencia, no detiene la progresión de la enfermedad y se postula que los metabolitos oxidativos derivados su catabolismo podrían acelerar la neurodegeneración en la EP (Arpa y Vivancos, 2004).

### **Agonistas Dopaminérgicos**

Los agonistas dopaminérgicos son fármacos que actúan directamente sobre los receptores de dopamina. Estos agentes no se metabolizan por vía oxidativa, de esta forma no se genera la producción de radicales libres propios del metabolismo de la dopamina. Su eficacia terapéutica no depende del número de neuronas dopaminérgicas funcionales, a diferencia de lo que sucede con fármacos como la L-DOPA o los inhibidores del metabolismo de la dopamina. Por esta razón, el uso en conjunto de los agonistas con medicamentos como lo es la L-DOPA permite reducir las dosis de los medicamentos disminuyendo la frecuencia de respuesta motora fluctuante (Chase et al., 1974).

Los representantes básicos de agonistas dopaminérgicos son: bromocriptina, pergolide, cabergolina, pramipexol y piribedil. Los efectos adversos que pueden provocar el uso de estos fármacos son náuseas, vómitos, hipotensión, alucinaciones, entre otros (Kuniyoshi y Jankovic, 2005).

### **Otros Fármacos**

Los mencionados anteriormente son los tratamientos farmacológicos efectivos más utilizados en el campo clínico para tratar los síntomas y padecimientos de la EP, sin embargo existe una amplia gama de compuestos que se usan como tratamiento para la EP. Un ejemplo de ello es la Resagilina que se usa como inhibidor de la MAO, este fármaco mejora el aspecto psicomotor de la EP. Algunos de sus efectos negativos son la producción de alucinaciones, náuseas, vómito e hipertensión (Lecht et al., 2007).

Otro grupo de medicamentos usados en la EP son los anticolinérgicos, que fueron las primeras drogas usadas para tratar la EP. Estos agentes se consideran como coadyuvantes, presentan un

buen sinergismo con la L-DOPA permitiendo reducir la dosis de la misma al tiempo que reduce los síntomas del movimiento involuntario. El problema con los agentes anticolinérgicos es la poca tolerancia por parte de los pacientes ancianos debido a sus efectos colaterales: retención urinaria, visión borrosa, constipación, xerostomía, taquicardia y confusión mental (Hurtig, 1980).

### **Tratamientos Quirúrgicos**

Dada la baja eficiencia de los tratamientos farmacológicos, la cirugía estereotáxica (CET) ha ganado una importancia creciente en el tratamiento de la EP. Numerosos grupos de investigadores han enfocado sus esfuerzos en proponer terapias alternativas a las farmacológicas para el tratamiento de la EP (Olanow et al., 1998).

La neurocirugía estereotáxica en humanos, introducida en la década de 1930-1940, permitió la colocación de un electrodo o sonda en el cerebro usando un atlas del cerebro como referencia además de neuro-imagen (Spiegel et al., 1946). El blanco fue basado originalmente en los resultados de la cirugía de “cerebro abierto”, con el propósito de realizar lesiones discretas en las estructuras profundas del cerebro, particularmente los GB (Spiegel et al., 1954; Hassler et al., 1954; Spiegel et al., 1958).

Después de su introducción, la CET rápidamente ganó la atención en el campo de la neurociencia. La CET fue implementada en varios países, innovaciones metodológicas fueron introducidas y se probaron diferentes zonas como blanco. Leksell llevó a cabo lesiones en diferentes partes del *globus pallidus* y observó que la palidotomía posteroventral mejoraba de forma significativa los síntomas parkinsonianos, incluyendo la acinesia, rigidez y temblor (Laitinen et al., 1992; Svännilsson et al., 1960)

La eficacia de la talamotomía, probada más adelante para reducir el temblor en la EP, fue particularmente impresionante. Este procedimiento rápidamente se convirtió en un tratamiento estándar para el temblor y permitió a la CET ser aceptada alrededor del mundo como procedimiento terapéutico para la EP (Hassler y Reichert, 1954; Selby, 1987).

## **Palidotomía**

En el año de 1952, Cooper ligó accidentalmente la arteria coroidea en un paciente con EP y reportó mejorías en los síntomas (Cooper, 1953). Este fenómeno fue explicado por la formación de una lesión isquémica en el glóbulo pálido interno. Subsecuentemente, múltiples intentos de crear lesiones en esta área fueron realizados pero con resultados inconsistentes aun usando técnicas estereotáxicas (Vitek, 1997).

Laitinen y Colaboradores en el año de 1992 realizaron la palidotomía posteroventral encontrando un marcado mejoramiento de los síntomas en la EP. La palidotomía posteroventral unilateral puede atenuar los efectos colaterales inducidos por la L-DOPA y las des-habilidades axiales (inestabilidad en la postura y alteraciones del paso) en pacientes tempranos con la EP. (Laitinen, et al., 1992)

## **Estimulación del glóbulo pálido interno (GPi)**

La estimulación del GPi o de alguna otra estructura dentro del cerebro se realiza por medio de un generador de pulsos eléctricos implantable que a su vez está conectado a una batería. Esperando que estos impulsos interfieran y bloqueen las señales eléctricas que causan los síntomas de la EP.

La estimulación del GPi tiene efectos clínicos semejantes a la palidotomía, lo anterior mejora todas las formas de parkinsonismo y los movimientos anormales e involuntarios (discinesias) inducidos por la L-DOPA. Esto depende de la localización de la estimulación del GPi, si ésta se da en la zona dorsal mejora la rigidez, acinesia y alteraciones en la marcha. Por otro lado, si se realiza en la zona posteroventral mejora las desinencias inducidas por la L-DOPA, la marcha y la acinesia. Si es en la región dorsal se presenta una mejora moderada de la acinesia y las desinencias inducidas por los fármacos (Pahwa et al., 1997).

## **Terapia de reemplazo celular**

Las terapias farmacológicas y quirúrgicas pueden ayudar significativamente en reducir algunos síntomas de la EP, particularmente en estados tempranos del padecimiento. Sin embargo, con el tiempo, la enfermedad progresa y a largo plazo se produce una gama de problemas secundarios

incluyendo el desarrollo de complicaciones motoras. En esta etapa de la enfermedad las terapias simples cada vez son más decepcionantes en términos de beneficios terapéuticos confiables y por tanto se buscan alternativas más invasivas como la implementación de bombas de infusión o procedimientos quirúrgicos descritos anteriormente.

Estas últimas terapias pueden ser muy efectivas, pero solo están enfocadas en reducir los síntomas y no así en reparar las zonas dañadas por la neurodegeneración y restablecer la neurotransmisión afectada en la enfermedad. Así, estos tratamientos también comienzan a fallar, en parte por la naturaleza progresiva de los aspectos no motores de la enfermedad y porque continúa la pérdida de neuronas dopaminérgicas.

Tomando en cuenta que en las enfermedades neurodegenerativas, el mesénquima cerebral se ve afectado por la pérdida de neuronas, una de las estrategias que se ha planteado, con el fin de restablecer la neurotransmisión y llevar a cabo un reemplazo de la zona dañada, es la del trasplante de tejido homólogo (Dunnett et al., 1981a, b, c; Dobrossy et al., 2010). Diversos grupos de investigadores han realizado experimentos en los que ponen a prueba tejido neural adulto o bien tejido mesencefálico obtenido de productos fetales no viables (Björklund y Stenevi, 1979; Björklund et al., 2003;). Los problemas que han atraído este tipo de terapias de reemplazo son numerosos, iniciado por complicaciones técnicas como es la gran demanda de productos fetales, que elevan el número de 3 a 7 por paciente; otras complicaciones son el rechazo inmunológico por parte del receptor, la variación de resultados entre los pacientes, y aún después de que las células se puedan colocar exitosamente, éstas terminan por sufrir el proceso neurodegenerativo de la zona dañada.

Otra de las alternativas que relativamente es nueva, es el trasplante de células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorenovarse por tiempos prolongados en cultivos, y mediante procesos fisiológicos normales o procesos experimentales, diferenciar en distintos tipos de células maduras y funcionales; estas células son conocidas como las células troncales (*stem cells*) (Zhu et al., 2009).

### **Trasplantes autólogos (Auto-injertos)**

El uso de los auto-injertos siempre ha sido una alternativa atractiva para el tratamiento de cualquier trastorno degenerativo incluyendo la EP, lo anterior debido a la facilidad de la toma de tejido que a la vez no implica limitaciones éticas o problemas inmunológicos presentes en injertos

de tejido alogénico o xenogénico. Por lo tanto, no es de extrañar que gran parte de los primeros trabajos sobre terapia celular para la EP se concentraran en fuentes celulares autólogas, aunque en general los resultados hasta la fecha han sido decepcionantes (Freed et al., 1981; Backlund et al., 1985; Freed et al., 1986; Morihisa et al., 1987; Lindvall et al., 1987; Goetz et al., 1989; Olanow et al., 1990).

### **Médula adrenal (MA)**

Los primeros intentos de trasplante celular autólogo en la EP incluyen el uso de tejido de MA, el cual secreta dopamina además de otras catecolaminas. Los primeros estudios en modelos animales de la EP fueron muy variables, pero aportaron evidencias eficaces de viabilidad y funcionalidad (Freed et al., 1981; Freed et al., 1986; Morihisa et al., 1987). A pesar de las incertidumbres acerca del modo de acción de los trasplantes de MA y los limitados beneficios funcionales observados en los experimentos, se iniciaron en la década de 1980-1990 pequeños ensayos clínicos con todos los problemas inherentes que existen cuando no se realiza un grupo control o placebo (un problema común en el campo clínico de reparación neural). No obstante, estos primeros estudios produjeron una mejoría leve y transitoria en los pacientes (Backlund et al., 1985; Lindvall et al., 1987), mientras otro grupo alrededor del mismo tiempo reportó mejorías motoras y cognitivas usando una técnica de neurocirugía abierta (Madrazo et al., 1987; Drucker-Colin et al., 1988). Sin embargo los resultados de estos estudios han sido cuestionados (Freed et al., 1990).

Subsecuentemente, otros estudios mostraron un modesto efecto positivo por un periodo limitado aproximado a los 18 meses (Goetz et al., 1989; Olanow et al., 1990). Además, estudios *post-mortem* revelaron baja sobrevivencia del tejido trasplantado (Hurtig et al., 1989; Kordower et al., 1991).

Con el fin de mejorar el trasplante de MA, se investigó el co-trasplantes de MA con tejido secretor de factor de crecimiento neural (*neural growth factor*: NGF). Los estudios en animales que sustentan el enfoque del co-trasplante de MA con tejido de nervios periféricos como fuente de NGF, mostraron mejorías en la sobrevivencia del trasplante y recuperación funcional (Date et al., 1994; Howel et al., 2000). Sin embargo, estudios clínicos con enfoques similares han reportado sólo modestas mejorías en relación con los parámetros de la escala unificada de la EP (of Unified Parkinson's Disease Rating: UPDRS). También se han realizado ensayos clínicos en los que el NGF se pone en contacto con el trasplante de MA de manera directa, con lo que se han reportado algunos beneficios (Olson et al., 1991). Sin embargo, los altos niveles de morbilidad y mortalidad asociados con las técnicas de obtención y trasplante de MA son significativos y a la fecha superan

los beneficios. Como resultado hay poca justificación para continuar con el trasplante de MA en la EP.

### **Neuronas ganglionares simpáticas (NGS)**

Las NGS han sido consideradas como una fuente de remplazo celular en la EP ya que expresan AADC y VMAT2 (proteínas involucradas en la producción y transporte de dopamina) en cultivo (Nakao et al., 2001), así como después del trasplante en un modelo roedor (Nakao et al., 2004). Su acción, se cree, es mediada por su habilidad de convertir y almacenar la dopamina encontrada en los espacios extracelulares. En los estudios clínicos las NGS se han recuperado del tronco simpático y trasplantado en el estriado de pacientes con EP (Horvath et al., 1990; Itakura et al., 1994; Itakura et al., 1997; Nakao et al., 2001; Nakao et al., 2004). Aproximadamente la mitad de los pacientes sometidos al trasplante tuvieron mejoría en la bradicinesia y en la marcha, pero no de forma significativa con respecto a los rangos de la UPDRS. Estos limitados beneficios clínicos, las técnicas invasivas y la morbilidad asociada al procedimiento que involucra la toma de tejido, convierten al trasplante de NGS una opción poco práctica para el uso clínico.

### **Cuerpo carotideo (CC)**

Las células del CC son conocidas por ser quimio-sensitivas y secretar dopamina, además de dividirse en respuesta a un estímulo hipóxico (McGregor et al., 1984; Espejo et al., 1998). Esas características han llevado a la exploración de su uso en reemplazo celular dopaminérgico para la EP; en modelos animales roedores y primates no humanos han demostrado recuperación funcional parcial después del trasplante intra-estriatal de agregados de CC (Espejo et al., 1998; Luquin et al., 1999; Toledo-Aral et al., 2003). Esto derivó en un estudio clínico, en el cual 13 pacientes de entre 43 y 61 años con EP avanzada fueron trasplantados de forma bilateral en el estriado con agregados de CC (Arjona et al., 2003). Lo anterior mejoró la puntuación motora de la UPDRS un año post-trasplante; en 6 pacientes evaluados después de 3 años la mejoría se mantuvo y esto parece estar correlacionado con la severidad de la enfermedad al momento del trasplante y la ausencia de atrofia fibrótica en las células del CC (Minguez-Castellanos et al., 2007). Sin embargo, la razón de la mejoría nunca estuvo clara. La sobrevivencia de células dopaminérgicas era sólo alrededor del 10% y los autores sugirieron que los beneficios del trasplante de CC estaban tal vez relacionados con la producción y liberación de factores tróficos en lugar de la liberación de dopamina.

## Trasplantes Alogénicos

### Spheramine™

Aunque se pensaba que la mejor opción en la terapia de reemplazo celular eran los trasplantes autólogos, ya que se sortean problemas éticos además de inmunológicos, a la par se han realizado diversos experimentos en los que se han utilizado fuentes celulares alogénicas. Una de ellas son las células del epitelio pigmentario de la retina (*retinal pigmentary epithelium*: RPE) que actúan como soporte celular en la retina y producen L-DOPA como parte de su vía de síntesis de melanina. Ellas también han mostrado tener efectos neurotróficos en neuronas mesencefálicas y estriatales *in vitro* (McKay et al., 2006), además se han investigado como fuente de células dopaminérgicas en la EP.

Cuando las células del RPE son trasplantadas junto con micro-portadores (*microcarriers*) su sobrevivencia se ve favorecida. Estudios en modelos roedores y primates de la EP demostraron mejorías en los síntomas motores y aumento de F-DOPA (Subramanian et al., 2002 Doudet et al., 2004). Posteriormente, se realizó un ensayo clínico abierto en el que las células RPE adjuntas a micro-portadores (Spheramine™) fueron trasplantadas unilateralmente en el putámen de 6 pacientes con EP avanzada. Esto trajo mejorías de hasta 48 % en los síntomas motores según la escala de la UPDRS al cabo de un año. Seguido a esto, se inició un estudio placebo-doble-ciego usando Spheramine™, sin embargo, no se ha detectado alguna diferencia significativa entre la cirugía con Spheramine™ y la cirugía control después de 12 meses de seguimiento, y el futuro de las células del RPE como fuente para el remplazo celular en la EP es poco claro (<http://www.mdvu.org/emoove/article.asp?ID=1192>).

### Trasplantes de mesencéfalo ventral de embrión

Los primeros reportes exitosos del trasplante de células dopaminérgicas fetales fueron reportados por dos grupos en el año de 1979. El procedimiento involucraba el trasplante alogénico de mesencéfalo ventral de embrión (MV) en modelos roedores de EP. Perlow y colaboradores colocaron el trasplante en el ventrículo lateral (Perlow et al., 1979), mientras que Björklund y Stenevi lo hicieron en una cavidad cortical dorsal (Björklund y Stenevi, 1979). En ambos estudios, se describió la recuperación funcional en pruebas motoras simples y estudios de análisis histológicos subsecuentes confirmaron esto, además de demostrar que había sobrevivencia del trasplante, elongación de fibras dopaminérgicas y formación sináptica (Freund et al., 1985). Si bien

las mejorías se observaron cuando el tejido era colocado en la región del estriado, los intentos de colocar el trasplante en la zona de la SNc, mostraron sobrevivencia del trasplante pero al parecer no se formaron elongaciones axoplásmicas al estriado y por tanto no se reportaron mejorías motoras (Dunnett et al., 1983).

Estos estudios alógenicos en animales fueron seguidos por el trasplante de tejido MV humano en ratas modelo de la EP. Se demostró que el MV fetal humano trasplantado en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA podía sobrevivir, integrarse, formar conexiones dopaminérgicas y producir mejorías funcionales (Brundin et al., 1986), estos resultados fueron mejorados en ratas inmunosuprimidas. Los estudios en animales generaron el camino para el traslado de ésta terapia experimental a pacientes humanos, aunque en este momento ya estaba claro que el trasplante de MV fetal humano no podía mejorar todos los déficits vistos en el modelo animal de la EP. Por tanto, sería ingenuo esperar que dichos trasplantes reviertan todos los aspectos de la EP, y esto debe tomarse en cuenta en cualquier interpretación de cualquier prueba clínica usando este recurso.

Las primeras pruebas clínicas se llevaron a cabo en la década de 1980 en México (Madrado et al., 1988) y Suecia (Lindvall et al., 1989) realizadas en 2 pacientes con EP en cada estudio. Estos estudios usaron tejido MV de desde 12 a 14 semanas y 8 a 10 semanas de gestación respectivamente, el cual fue trasplantado en el estriado con mínimas mejorías clínicas, al menos en los pacientes de Suecia. Sin embargo, con el mejoramiento de las técnicas, varios estudios subsecuentes demostraron mejorías significativas en un número de parámetros, incluyendo los de la UPDRS (Freed et al., 1992; Hauser et al., 1999; Lindvall et al., 1990; Lindvall et al., 1994). Estas mejorías clínicas han sido sostenidas y asociadas con el aumento de F-DOPA, también se ha observado regulación en la liberación de dopamina y activación de las áreas corticales motoras (Piccini et al., 1999; Piccini et al., 2000). Además estudios *post-mortem* (18 meses después del trasplante) demostraron la sobrevivencia de las células de MV fetales (poco más de 80 mil y 135 mil células TH positivas) con re-inervación estriatal mediada por el trasplante (Kordower et al., 1996). Por lo tanto, las conclusiones fueron que los trasplantes alógenicos de células del MV fetales podían sobrevivir en los pacientes con EP, siendo integradas funcionalmente y produciendo beneficios clínicos sostenidos. Sin embargo, los resultados fueron variables y uno de los retos fue el de explicar esta variabilidad y cómo podría ésta minimizarse, más adelante el problema aumentó con publicaciones posteriores que cuestionan fuertemente este recurso (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2001; Björklund et al., 2003)

Con el éxito de las pruebas clínicas iniciales y la necesidad de apoyar adecuadamente la eficacia real del procedimiento, se realizaron dos estudios control doble-ciego del trasplante de MV fetal en pacientes con EP. La primera prueba fue publicada en el año 2001 por Freed y colaboradores.

En ella se usaron 40 pacientes con EP entre 34 y 75 años y con duración media de la enfermedad de 14 años (Freed et al., 2001). Los pacientes fueron asignados de forma aleatoria para recibir el trasplante o la cirugía control. El tejido fetal fue obtenido de embriones de 7 a 8 semanas de edad, cultivado en medio F12 al 5% de suero humano de placenta. El trasplante se llevó a cabo bajo anestesia local con paciente despierto y se usó para ello la neuro- cirugía estereotáxica. El tejido de dos embriones fue trasplantado en el putámen de cada hemisferio y el paciente no fue inmunosuprimido. En los demás pacientes se realizó la cirugía control que recibieron una trepanación sin penetración de la duramadre. Los primeros resultados, generados por una valoración subjetiva de la mejoría clínica 1 año después del trasplante, revelaron que no existía una mejoría significativa del grupo con trasplante y el grupo control. No obstante, se observaron mejorías significativas según los parámetros de la UPDRS en pacientes con edades menores a los 60 años de edad. Sin embargo, análisis subsecuentes sugirieron que la causa de esta mejoría fue la respuesta pre-operativa a la L-DOPA más que la edad de los pacientes, ya que incluso los pacientes mayores con buena respuesta pre-operativa de L-DOPA mostraron mejorías similares (Björklund et al., 2003). Las mejorías principales se observaron en la rigidez y en los pacientes más jóvenes en la bradicinesia, en el temblor no se observó alguna mejoría. A pesar de los modestos y variables beneficios clínicos, los estudios con PET mostraron un incremento significativo en el aumento del metabolito F-DOPA en el putámen de los pacientes trasplantados y estudios *post-mortem* mostraron sobrevivencia neural dopaminérgica y desarrollo de fibras en el trasplante. Además, el número de células sobrevivientes fue menor que el reportado en otros pacientes con mejorías clínicas después de ser trasplantados (Freed et al., 2001). Un punto de delicado interés en este ensayo fue la primera descripción del desarrollo de importantes discinencias inducidas por el trasplante (*graft induced dyskinesias*: GID) en el 15% de los pacientes trasplantados después de un año, en ellos las complicaciones ocurrían en la ausencia de medicamento pero en presencia del trasplante. Muchos de estos pacientes requirieron intervención quirúrgica para aliviar las GID (Olanow et al., 2001).

## **Xenotrasplantes**

### **Tejido Porcino**

Los xenotrasplantes involucran el trasplante de tejido de una especie a otra (interespecífico), y el tejido neural de embriones de cerdo ha sido, por mucho, considerado la fuente animal más adecuada para el trasplante en cerebros humanos, debido a su facilidad de reproducción, la similitud en el tamaño del tejido cerebral con respecto al humano y el potencial de modificación genética en el tejido porcino. Los primeros trabajos sobre xenotrasplantes en la EP demostraron crecimiento axonal y desarrollo dendrítico más largo de las células trasplantadas además de un mayor índice de migración (Victorin et al., 1990; Deacon et al., 1994; Isacson et al., 1995;

Armstrong et al., 2002; Hurelbrink et al., 2002) lo que sugirió que los xenotrasplantes pudieran tener una ventaja principal sobre los trasplantes alogénicos en términos de su habilidad para dirigirse a la patología y recrear nuevos circuitos.

Tomando en cuenta lo anterior se llevó a cabo un pequeño ensayo clínico en el que se trasplantó MV de porcino en pacientes con EP. En este estudio realizado por Schumacher y colaboradores, 12 pacientes con EP fueron trasplantados unilateralmente en el estriado con tejido del MV porcino (Fink et al., 2000). Hubo mejoría respecto a los parámetros de la UPDRS, pero no hubo incremento significativo en F-DOPA y estudios *post-mortem* revelaron la sobrevivencia de solo 638 células TH positivas de alrededor de 12 millones trasplantadas, además de infiltración de linfocitos sobre y alrededor del trasplante, a pesar de que el paciente fue inmunosuprimido con Ciclosporina (Deacon et al., 1997).

Estos estudios han mostrado resultados decepcionantes, lo que limita el entusiasmo para su inclusión en el campo clínico, especialmente el tejido xenogénico para la terapia de reemplazo celular en la EP siempre tendrá que lidiar con algunas complicaciones adicionales comparado con los trasplantes alogénicos, primero hay problemas con el incremento de la respuesta de rechazo inmunológico y segundo hay un riesgo potencial de transmisión de retrovirus endógenos porcinos al paciente, lo cual puede ser el inicio de un nuevo padecimiento (Sayles et al., 2004). Tomando en cuenta lo anterior es necesario llevar a cabo más trabajos que permitan dilucidar el posible potencial clínico de este tipo de trasplantes.

### **Trasplantes de Células Troncales**

Las células troncales (*stem cell*) son un tipo celular que se distingue por su capacidad de auto renovación así como de diferenciar a tipos celulares especializados, las células troncales se han identificado en varios sitios del organismo y en distintos estadios del desarrollo (Morrison, et al.; 1997). Este tipo celular se ha considerado como el principal candidato para las terapias de reemplazo incluyendo la EP, lo anterior debido a su capacidad proliferativa y su, relativamente, fácil manipulación *in vitro* (Lindvall, 2003).

El principal objetivo de cualquier terapia de reemplazo en la EP basada en células troncales, incluye el generar protocolos de cultivo que puedan producir un gran número de células trasplantables, adecuada sobrevivencia y eficacia funcional de éstas, además de evitar posibles

efectos secundarios como lo es el desarrollo de un tumor o una respuesta inmunológica severa (Zigova et al., 1998).

### **Precursores Neurales**

Las precursoras neurales (*neural precursor cell: NPC*) son un tipo de células troncales que están comprometidas al linaje neural y pueden generar solamente neuronas, oligodendrocitos o astrocitos, aunque se ha propuesto que pueden ser más multipotentes (Bjornson et al., 1999). Los NPC se pueden encontrar en el tejido neural fetal o adulto, además de derivarse de células troncales embrionarias. Los NPC han sido aislados de tejido neural fetal tanto humano como no humano (Davis y Temple, 1994; Gage, 2000); y en relación con la EP estos precursoras se han propuesto como fuente de trasplante.

En términos de proliferación y de diferenciación, los NPC neurales de todas las regiones del sistema nervioso en desarrollo han mostrado capacidad de proliferación *in vitro* en presencia de factores de crecimiento, y después de ser expandidos de forma prolongada ellos parecen retener algunas de sus propiedades relacionadas a su región de origen. Así, la diferenciación dopaminérgica está incrementada a partir NPC provenientes del mesencéfalo ventral, comparado con NPC provenientes de otras regiones del cerebro (Horiguchi et al., 2004).

Cierto número de estudios han explorado la formación de neuronas dopaminérgicas a partir de NPC como en el estudio de Studer y colaboradores en el 2008. En este estudio se demostró que precursoras neurales de MV pueden ser amplificadas *in vitro* para posteriormente ser diferenciados a células TH positivas, con beneficios funcionales al ser trasplantadas en un modelo de la EP .

Se han realizado diversos trabajos a partir de la recuperación de NPC, aumentando su sobrevivencia o el porcentaje de diferenciación a células TH positivas, sin embargo dentro del campo del trabajo clínico no se han tenido respuestas similares a las observadas en los modelos animales, que por lo regular son deseadas, en el campo clínico los precursoras son obtenidos de tejido fetal representando problemas éticos y técnicos.

## **Células Troncales Mesenquimales**

Las células troncales mesenquimales (MSC), son células multipotentes que se encuentran en el estroma de la médula ósea y están presentes en el organismo adulto (Bianco et al., 2001). *In vivo* usualmente son usadas para derivar osteocitos, condrocitos y adipocitos, pero pueden tener el potencial de formar otros tipos celulares no mesenquimales incluyendo neuronas (Jiang et al., 2002; Kim et al., 2006). Las células con potencial neurogénico también se han encontrado en sangre periférica y por tanto representan potencialmente una fuente muy accesible de células para el trasplante autólogo en enfermedades degenerativas incluyendo la EP.

Las MSC se han aislado tanto en médula de roedor y de humano, y se han diferenciado a neuronas dopaminérgicas usando protocolos definidos que involucran la transfección de genes y factores de crecimiento. Usando éste método, fueron trasplantadas en un modelo roedor de la EP, ellas demostraron migración, secreción de dopamina y mejorías funcionales. A pesar de estos resultados positivos, existe cierta incertidumbre respecto a su verdadero potencial y el mecanismo de acción que pudiese estar generando las mejoras (Dezawa et al., 2004).

## **Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPS)**

Los avances recientes en el estudio de las células pluripotentes se enfocan en la obtención de células troncales a partir de la reprogramación de células somáticas, lo anterior implica un campo de estudio muy excitante por su posible importancia en los trasplantes autólogos.

La habilidad para reprogramar células adultas ha sido un área de estudio muy activa y relativamente nueva. Takahashi y Yamanaka mostraron que células tipo células troncales embrionarias podrían derivarse de fibroblastos de tejido embrionario y adulto a través de la expresión de 4 factores de transcripción: Oct 3/4, Sox 2, c-Myc y Klf 4, usando para ello vectores virales (Takahashi y Yamanaka, 2006). Estas células fueron llamadas células troncales pluripotentes inducidas o células iPS por sus siglas en inglés (*induced pluripotent stem cells*) mismas que mostraron muchas de las propiedades de las células troncales embrionarias como la formación de cuerpos embrioides *in vitro* y teratomas *in vivo* además de diferenciar en varios tipos celulares especializados, también algunas características fueron similares, pero no idénticas, en la expresión génica y estados epigenéticos (Rodolfa and Eggan, 2006).

Las células iPS pueden ser usadas a manera de fuente celular en el desarrollo de terapias de remplazo para los padecimientos degenerativos. El primer paso para el uso de estas células en la EP ha sido dado por Werning y colaboradores. Ellos generaron células dopaminérgicas a partir de células iPS derivadas de fibroblastos de ratón, las células TH positivas fueron trasplantadas en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA, en algunas ratas en las que existían remanentes de células pluripotentes se formaron teratomas por la proliferación de las células en la zona del trasplante, sin embargo con técnicas de “limpieza” de cultivo este problema se mitigó (Wernig et al., 2008).

### **Células Troncales Embrionarias**

Las células troncales embrionarias (*embryonic stem cells*) (CTE) son células que se extraen de la masa interna del blastocisto y tienen el potencial de auto-renovarse y diferenciar en todos los tipos celulares del organismo (Christophersen y Helin, 2011; Young, 2011). Tras el aislamiento inicial de CTE de la masa interna del blastocito de ratón en el año de 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), el primer reporte del establecimiento de una línea de CTE se reportó por Thomson y colaboradores en el año de 1998.

En relación con la EP, mucho trabajo se ha dedicado al uso potencial de las CTE como fuente de células dopaminérgicas para el remplazo celular y gran número de métodos se han explorado para tratar de persuadir a las CTE a adoptar el fenotipo dopaminérgico. El desarrollo de células dopaminérgicas a partir de las CTE es un proceso complejo que involucra una serie de etapas tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyéndose la formación de células troncales neurales, y los mecanismos precisos involucrados aun no son conocidos en su totalidad (Wilson and Edlund, 2001; Ben-Hur et al., 2004; Gerrard et al., 2005; Iacovitti et al., 2007).

Las CTE de ratón han sido cultivadas y trasplantadas directamente en el estriado de ratón, y se ha observado su diferenciación al linaje dopaminérgico y encontrado evidencia de recuperación funcional, pero de igual forma se ha observado la formación de teratomas a razón de los remanentes de células troncales no diferenciadas, lo anterior se ha observado en un número significativo de animales (Björklund et al., 2002). La formación de precursores neurales (células troncales neurales con la capacidad de diferenciar en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos) se ha logrado a partir de células troncales embrionarias (Li et al., 1998; Ying et al., 2003), estos precursores neurales generados por CTE de ratón pueden prolongar su expansión y además diferenciar a neuronas y astrocitos por la privación secuenciada de factores de crecimiento *in vitro* e *in vivo* después de ser trasplantadas en el cerebro de ratón (Conti et al., 2005).

Las CTE humanas muestran propiedades similares *in vitro*. Sin embargo, el número de células positivas a TH resultante de los métodos es bajo (Kim et al., 2002; Reubinoff et al., 2001; Zhang et al., 2001).

Se han descrito varios protocolos en los que se ha mejorado la derivación de células dopaminérgicas a partir de CTE además de su sobrevivencia, el mejor de ellos hasta el momento por el porcentaje final de células positivas a TH *in vitro* es el reportado por (Cho et al., 2008).

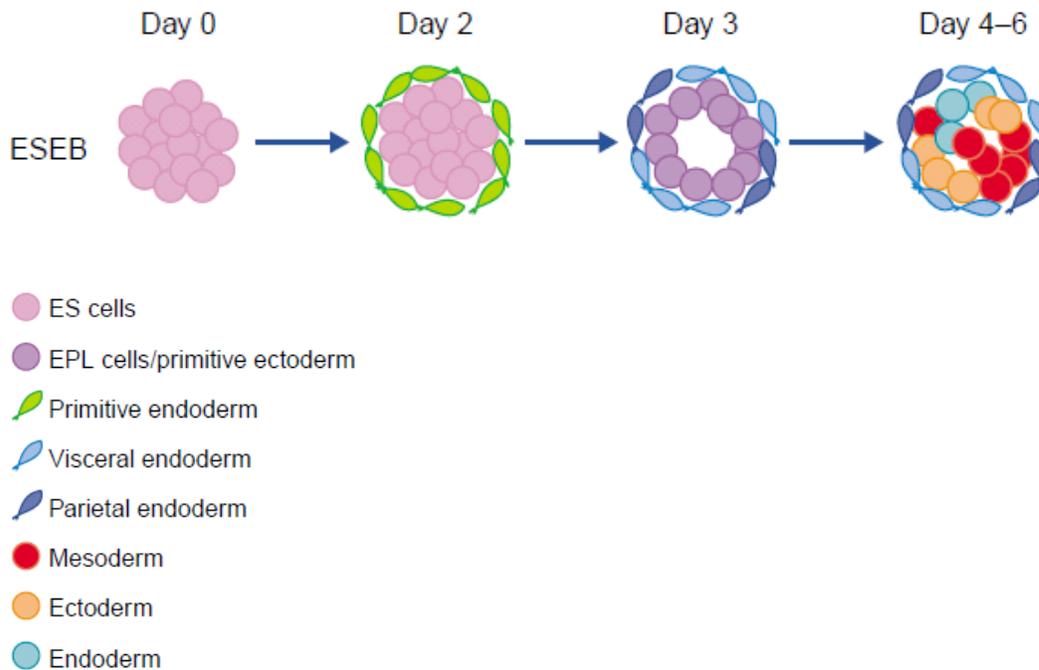
El trasplante de células dopaminérgicas derivadas de CTE generalmente tiene una sobrevivencia deseable y produce mejorías en la conducta de modelos roedores de la EP (Kim et al., 2002; Park et al., 2005; Roy et al., 2006; Yang et al., 2008). Sin embargo estudios en los que se usan células dopaminérgicas derivadas de CTE humanas han sido decepcionantes en términos de recuperación funcional. Existen dos formas principales del uso de las CTE como fuente de trasplante en la EP. Uno de ellos es pre-diferenciar las células al linaje dopaminérgico *in vitro* para después ser trasplantadas, de esta forma las CTE virtualmente se podrían convertir en una fuente inagotable de células dopaminérgicas, sin embargo como se ha mencionado antes, los protocolos de diferenciación no son en su totalidad efectivos en cuestiones de viabilidad y pureza, por tanto, se necesitan de muchas mejoras para su estandarización y su posible aplicación clínica. La segunda alternativa es que las células troncales se diferencien en células TH positivas una vez colocadas en el SNC ya sea el estriado o la SNc. Estas neuronas pueden integrarse mejor comparadas con las previamente diferenciadas y, en un escenario ideal, reconstruir la vía de neurotransmisión dopaminérgica. Sin embargo, la forma en que se pueda lograr esto es aún desconocida. Sería necesario para lo anterior instruir a las células una vez colocadas en el cerebro dañado a diferenciar hacia dopaminérgicas y sustituir así la función pérdida (Lindvall, 2003).

### **Cuerpos Embrioides**

La formación de cuerpos embrioides (CEs) es el paso principal en los protocolos de diferenciación de las CTE. Cuando las CTE son cultivadas en presencia del factor inhibidor de leucemia (LIF) o en co-cultivo con fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) las células troncales retienen su pluripotencia y son capaces dividirse de forma indefinida (Keller, 2005; Murry y Keller, 2008). Cuando las CTE son cultivadas en ausencia de LIF o MEF, las células diferencian espontáneamente y forman agregados tridimensionales (3D) llamados CEs (Rathjen y Rathjen, 2001) [Fig. 5]. Esta estructura 3D facilita la interacción multicelular, en la cual el contacto célula-célula existe y puede que se generen uniones de tipo gap. En un CE se pueden encontrar células de tejido endodérmico, mesodérmico y ectodérmico, lo cual recapitula muchos aspectos de la diferenciación celular

durante la embriogénesis temprana y derivar en células de las tres capas germinales (Desbaillets et al., 2000)[Fig. 5]. Por esta razón, la formación del CE ha sido utilizada ampliamente como paso transitorio en la diferenciación *in vitro* de CTE tanto de ratón como de humano.

Los CEs deben su nombre a su capacidad para recapitular algunas de las etapas tempranas de la embriogénesis de mamíferos. Para generar los CEs, las CTE se colocan en suspensión y en ausencia de factores anti-diferenciación para promover la agregación celular y su diferenciación. Después de dos días, las células que conforman la estructura del CE pueden adquirir dos identidades de acuerdo con su posición en el agregado 3D. Las células de la periferia diferencian a endodermo primitivo y pierden la expresión del factor de transcripción Oct 4 (marcador de pluripotencia expresado en CTE). Las células del centro se mantienen pluripotentes (expresan Oct 4) y además adquieren la expresión de Fgf 5, indicando la aparición de células de ectodermo primitivo. Entre los dos y tres días de formación del CE, el ectodermo primitivo comienza a formar un epitelio columnar a partir del cual se generarán células de las tres capas germinales del embrión, de forma similar a la etapa de gastrulación. A los cuatro días de formación del CE, el endodermo primitivo ha diferenciado a endodermo parietal y endodermo visceral. En esta etapa, las células del ectodermo primitivo del CE han diferenciado a precursores ectodérmicos positivos a Fgf 5, precursores mesodérmicos positivos a Brachyury y endodérmicos positivos a Afp (alfa fetoproteína). Posteriormente, estos precursores darán origen a neuronas, glía, cardiomiocitos, macrófagos y eritrocitos, entre otros tipos celulares (Baizabal y Covarrubias, 2009; Bratt-Leal et al., 2009; Rathjen y Rathjen, 2001; Rathjen y Rathjen, 2002).



**Figura 5 Representación esquemática de la formación y composición de un cuerpo embriode.**

La formación de los cuerpos embrioides inicia al colocar en suspensión *in vitro* a las células troncales embrionarias (rosa) para formar agregados de la forma simple (día cero), en los cuales las células externas comienzan a diferenciar a endodermo primitivo (verde, día dos). Al día 3, las células más internas generan un ectodermo primitivo (morado) que se organiza de forma columnar, mientras que el endodermo primitivo diferencia a endodermo visceral (azul claro externo) y parietal (azul oscuro). Del día 4 al 6, las células del ectodermo primitivo generan progenitores ectodérmicos (naranja), mesodérmicos (rojo) y endodérmicos (azul claro interno) (Rathjen and Rathjen, 2001).

Hasta el momento no hay reportes del uso de los CE como material de trasplante en alguna enfermedad degenerativa o neurodegenerativa.

En el año de 1997 Brustle y cols, trasplantaron células de CE en los ventrículos de embriones de ratas. Las células trasplantadas formaron estructuras neuroepiteliales y migraron a varios puntos del tejido cerebral. También observaron que las células podrían generar tipos neuronales y gliales dependiendo de la zona con la que tuvieran contacto; con lo anterior concluyeron que las células de CE tienen el potencial de responder a las señales y podrían tener la capacidad de reconstituir linajes neuronales y gliales en el SNC (Brustle et al., 1997).

## Antecedentes

Tomando en cuenta que la diferenciación de las células troncales embrionarias depende de su capacidad para interpretar las señales del entorno en el que se encuentren y que aun no está claro qué estadio de diferenciación es el óptimo para producir los múltiples linajes neuronales en respuesta a las señales del cerebro embrionario en desarrollo, Baizabal y Covarrubias en el 2008 trasplantaron las células troncales en explantes de cerebro medio en desarrollo, zona en la que la neurogénesis se lleva a cabo normalmente en la formación del cerebro medio. Así demostraron que la transición de las células troncales embrionarias a cuerpos embrioides es necesaria para la posterior diferenciación a células dopaminérgicas alrededor de la línea media ventral del cerebro medio. Lo anterior es posible ya que en esta zona del mesencéfalo del cerebro medio en desarrollo existen señales de diferenciación neural que pueden ser interpretadas en este caso por las células troncales embrionarias en un estadio de cuerpo embriode.

Björklund y Colaboradores en el 2006, con el fin de proponer una fuente celular confiable que sirviera en la terapia de reemplazo celular para la EP, trasplantaron células troncales embrionarias en forma de cuerpo embriode a nivel de estriado en ratas lesionadas con 6-OHDA. Ellos reportan que las células trasplantadas diferencian de forma aleatoria a células dopaminérgicas con identidad mesencefálica y son capaces de liberar dopamina, lo que se tradujo en un restablecimiento gradual y prolongado de la conducta motora, sosteniendo así, que las células troncales embrionarias pueden restablecer la función cerebral pérdida en el modelo roedor de la EP.

Zhu y Colaboradores en el 2009, investigaron el efecto del trasplante de células troncales neurales (NSC) en un modelo roedor de EP. Ellos trasplantaron las células en un punto cercano a la sustancia nigra pars compacta y en el estriado de animales con lesión. Ellos encontraron que con el trasplante de las NSC en cada uno de los sitios reduce de forma significativa la conducta de giro inducida por apomorfina en los roedores con EP, también reportan que la sobrevivencia de las células trasplantadas se extiende hasta 4 meses post-trasplante con una diferenciación significativa a células positivas al marcaje de la enzima Tirosina Hidroxilasa y que son capaces de migrar posteriormente y ventralmente hasta llegar a la región de la sustancia nigra pars compacta. Ellos discuten que la sobrevivencia prolongada del trasplante se debió a la capacidad de las células troncales a interpretar las señales del entorno y la migración además de la diferenciación, fue gracias a la producción elevada de factores de crecimiento y citocinas por astrocitos y microglía encontrada en regiones de amplio daño celular o lesiones tisulares.

## Justificación

De la variedad de células troncales, las más promisorias parecen ser, hasta el momento, las células troncales embrionarias y las células pluripotentes inducidas. Sin embargo es necesario llevar a cabo estudios que permitan el desarrollo y la optimización de la seguridad y eficacia de las técnicas involucradas en la manipulación y generación de éstas, lo que permitirá resolver, de igual forma, qué fuente celular y cuáles de sus características manipulables son las más apropiadas en la terapia de reemplazo celular de la EP, antes de que más ensayos clínicos sin precedencia sean realizados.

Una de las características importantes de muchos de los tipos de células troncales, es la capacidad que poseen para interpretar y responder a las señales de su entorno, tanto en condiciones fisiológicas normales o en condiciones experimentales. Diferentes señales permitirán a las células troncales seguir un patrón de división continua traducida en una auto-renovación, o bien diferenciar, a través de una serie de etapas, a un tipo celular linaje-específico.

Se ha demostrado en trabajos descritos previamente, que las células troncales embrionarias deben diferenciarse a células de CE para responder a las señales de un entorno neurogénico tanto *in vitro* como *in vivo*, y en caso de no encontrarse estas señales las células adoptarán fenotipos funcionales de distintos tipos celulares, no necesariamente neurales. También se ha demostrado que los CE tienen la capacidad de diferenciar de manera significativa a células dopaminérgicas del cerebro medio o precursoras de éstas, si en su entorno se encuentran las señales apropiadas, fenómeno que no se observa en el estadio previo a su formación (células troncales embrionarias) o etapas más avanzadas de diferenciación (precursores neurales). En este sentido representaría un paso fundamental conocer si en la SNc de organismos adultos se encuentran las señales adecuadas de diferenciación neuronal.

Hasta el momento no se conoce con certeza si la SNc es, o no, un nicho neurogénico, o si al menos en esa región del mesencéfalo existen señales de inducción neuronal. Además de la región sub ventricular y el hipocampo, regiones de neurogénesis en cerebro adulto, diversos reportes se han publicado sobre la generación de nuevas neuronas en la neo-corteza, el estriado, el hipotálamo, la amígdala y la SNc (Gould, 2007). Debido a que en estas zonas la neurogénesis es poco abundante estos reportes son aún controversiales, ya que en gran parte dependen de la sensibilidad del método empleado para evaluar la generación de *novο* de las neuronas (Gould, 2007).

En el caso del cerebro medio adulto, estudios iniciales demostraron que en esta región existen precursores neuronales que producen exclusivamente células gliales *in situ*, aunque presentan capacidad neurogénica al ser aisladas y diferenciadas *in vitro* (Lie et al., 2002) Estos datos apuntaron a que podría ser el nicho adecuado de diferenciación dopaminérgica, más que solo una población de precursores neurales, lo que estaba ausente en el cerebro adulto. La tasa de recambio estimada permitiría una renovación completa de la población de neuronas dopaminérgicas durante la vida adulta del ratón (Zhao et al., 2003). Sin embargo usando esta misma estrategia experimental estos hallazgos no fueron observados por otros grupos (Cooper e Isacson, 2004; Frielingston et al., 2004), manteniéndose la controversia sobre la existencia de neurogénesis dopaminérgica en la SNc del adulto.

### **Hipótesis**

Las células troncales embrionarias en un estado de diferenciación temprano, como lo es el cuerpo embrioide, son capaces de iniciar un proceso de diferenciación neuronal en la SNc de rata.

### **Objetivo General**

Evaluar la sobrevivencia y diferenciación de células de cuerpo embrioide trasplantadas en la SNc de rata sin lesión y lesionadas con 6-OHDA.

### **Objetivos Particulares**

Determinar el periodo óptimo post-lesión para llevar a cabo el trasplante de CEs en el modelo de la EP (8 ó 15 días).

Cuantificar el número de células presentes en cada evaluación del trasplante en ratas sin lesión y ratas con lesionadas con 6-OHDA (6, 15 y 30 días).

Evaluar la diferenciación de las células de CEs por el inmunomarcaje para Nestina (NES), Doble cortina (DCX), NeuN y Tirosina Hidroxilasa (TH).

Realizar la comparativa de sobrevivencia y diferenciación entre animales con lesión y animales no lesionados.

## **Materiales y Método**

### **Animales**

Se usaron ratas Wistar macho, de un peso ente 250 y 280 gramos, comprados al bioterio del Instituto de Fisiología Celular – UNAM. De cada grupo de 10 animales, la mitad recibió la inyección de la 6-OHDA y la otra mitad se mantuvo intacta hasta el momento del trasplante. La asignación se realizó de manera aleatoria.

Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura y bajo un ciclo de 12:12 horas de Luz/Oscuridad, abastecidos de agua y comida *ad libitum*, con todas las normas de cuidado del Comité de Bioética y Cuidado de Animales Experimentales del Instituto de Fisiología Celular – UNAM y la Norma Oficial Mexicana.

Los animales que fueron sometidos a los procedimientos quirúrgicos fueron anestesiados vía intraperitoneal con Ketamina:Xilacina en proporción de volumen 9:1, esta fue inyectada en una dosis de 0.1 ml por cada 100g de peso.

### **Lesión con 6-OHDA y Prueba de Giro**

Los animales, una vez montados en el equipo de cirugía estereotáxica, recibieron la inyección unilateral de la 6-OHDA (4µg), usando para ello un inyector automático y una cánula Kendal (10G-diámetro) insertada en la SNc, siguiendo las coordenadas AP: -4.7, ML:-1.6 y DV: -8.1 milímetros con respecto a bregma. Seis y quince días después de la inyección fueron retados a la prueba conductual de giro inducida por anfetamina (inyección intraperitoneal 0.4mg/100g) en un periodo de 30 minutos. Sólo las ratas con un número de giros ipsilaterales superior a los 350 fueron consideradas lesionadas. En cada prueba se incluyó un roedor sin lesión como control.

## Formación de CEs

En cajas de cultivo de 6cm cubiertas con gelatina de piel de porcino al 1% se sembraron células STO alimentadoras (*feeders*) ( $2 \times 10^6$  células) junto con 4ml de medio STO.

Una vez que las células cubrieron al menos el 85% de la superficie de la caja de cultivo (confluencia) se descongeló una alícuota de CTE de la línea R1B5 que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein: GFP*) ( $1 \times 10^6$  células) y se re-suspendieron en 2ml de medio M15, se colocaron en las cajas con células STO junto con 2ml de medio M15, lo anterior después de aspirar el medio STO de las células alimentadoras. Las células se dejaron en estas condiciones 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con un cambio de medio a las 24 horas.

Para el sub-cultivo de células se realizó el cambio del medio 3 horas antes de iniciar con el procedimiento, una vez transcurrido el tiempo se aspiró el medio M15 de las cajas con células STO y CTE, posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X estéril. Para lograr que las células adheridas a las cajas pudieran ser recuperadas se adicionaron 0.5ml de tripsina al 0.25% y se agitó suavemente antes de incubar a 37°C durante 10 minutos, concluidos los 10 minutos la tripsina se inactivó con 1.0 ml de medio M15 y se dispersaron las células mecánicamente con ayuda de la pipeta, para después adicionar 1ml más de medio M15 y se estimó el número de células por conteo en cámara de Neubauer. Una vez estimado el número las células se recuperaron en un tubo Falcon y se centrifugaron por 5 minutos a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 2ml de medio M15. Del nuevo pool de células se utilizó 1ml para sembrar (~2, 600, 000 células) en cajas de 10ml previamente gelatinizadas sin células STO, con 8.9 ml de medio M15 y 100µl de LIF al 1%. Las células se cultivaron en estas condiciones de 3 a 4 días con cambio de medio cada 24 hrs.

Con el fin de formar los CEs se aspiró el medio de las cajas de 10ml y se lavó la superficie con 2ml de PBS 1X estéril, se agregó 1ml de tripsina al 0.25% y se incubó por 10 minutos. Se inactivó la tripsina con 1.5 ml de medio M15, se recuperaron las células en un tubo Falcon y se centrifugaron 5 min a 1000 rpm, se quitó el sobrenadante y se resuspendió en 5ml de medio M15 hasta no observar grumos y se contó en cámara Neubauer. Del pool se sembraron 250µl (~2, 000, 000 células) en un plato bacteriológico (que evita la adhesión de las células). Las células se cultivaron en estos platos durante 4 días y el medio se cambió una sola vez a las 48 horas.

## **Preparación de CEs para trasplante**

Para realizar el trasplante, se tomaron los CEs con una pipeta de 25ml para no dañar los agregados celulares y se colocaron en un tubo Falcon, se dejaron sedimentar por 5 minutos para después aspirar el medio y agregar tripsina al 0.25%, de esta forma se incubaron durante 15 min a 37°C, posteriormente se inactivó la tripsina con 4ml de medio M15 y se re suspendió mecánicamente para centrifugar 3 minutos a 1000rpm. La pastilla resultante se suspendió en 50µl de medio Optimem (OP). Por último se realizó el conteo en la cámara de Neubauer antes de trasplantar.

## **Trasplante de CEs**

Se realizó el trasplante en animales con 8 y 15 días después de la lesión, este ensayo fue programado para precisar el momento óptimo que promoviera la sobrevivencia de las células trasplantadas.

Las células fueron trasplantadas de forma manual con una jeringa Hamilton de 10 µl a una velocidad de 0.1µl/min usando para ello cirugía estereotáxica, en las coordenadas mencionadas anteriormente para la SNc. El número de células trasplantadas fue de aproximadamente 150 mil.

## **Controles**

Se trasplantaron las células del CE en una región que es conocida como región no neurogénica y sin capacidades de inducción neural específica, como lo es el estriado de un animal sin lesión. Además, se colocaron en la zona de la SNc células totalmente indiferenciadas (CTE) de la misma línea, R1B5, para comparar su comportamiento con respecto a las células del CE.

## **Perfusión intracardiaca**

Con el fin de fijar el cerebro para realizar los estudios histológicos correspondientes del trasplante y llevar a cabo los procesos inmunofluorescencia se realizó la técnica de perfusión intracardiaca, para lo anterior el animal fue sacrificado por sobredosis de pentobarbital sódico administrado vía

intraperitoneal y se diseccionó de manera que fue visible el corazón y los pulmones, se pinzó la aorta abdominal descendente, se punzó el corazón a través ventrículo izquierdo con una cánula y se cortaron las aurículas; con ayuda de una bomba de perfusión se hizo pasar PBS (0.1M) (mantenido en hielo) con el fin de drenar la sangre del sistema, posteriormente se bombearon 250 ml de paraformaldehído (4%) y se concluyó con la extracción del cerebro y su postfijado en tren de sacarosa 10, 20 y 30% 24 hrs en cada solución. Al tercer día los cerebros fueron congelados usando 2metil-butano y hielo seco para ser conservados a -20°C.

### **Análisis Histológico**

Se realizaron cortes coronales, por congelación, de 40 µm de grosor, de las regiones del estriado y SNC, se almacenaron de forma individual en solución anticongelante y almacenados a 4°C hasta su selección para realizar los inmunomarcajes correspondientes. Los cortes a nivel de estriado, fueron procesados con la técnica de inmunohistoquímica para TH, con el fin de evaluar la calidad y proporción de lesión con 6-OHDA. Las rebanadas de tejidos correspondientes a la SNC se seleccionaron bajo microscopía de epifluorescencia para evaluar la sobrevivencia del trasplante basándonos en la señal positiva de la proteína verde fluorescente. Los cortes seleccionados fueron procesados para inmunotinción con marcadores específicos como doblecortina (DCX), Nestina (Nes), NeuN y Tirosina hidroxilasa (TH). El marcaje de núcleos se realizó con el marcador DRAQ-5. Se obtuvieron fotografías digitales, además de reconstrucciones ortogonales con microscopía confocal.

### **Conteo**

Los conteos para evaluar la sobrevivencia celular y su co-localización con los marcadores usados, se hicieron sobre las imágenes ortogonales obtenidas en microscopía confocal. Para cada condición se contaron dos campos de dos rebanadas a nivel de SNC a un aumento de 40x por rata.

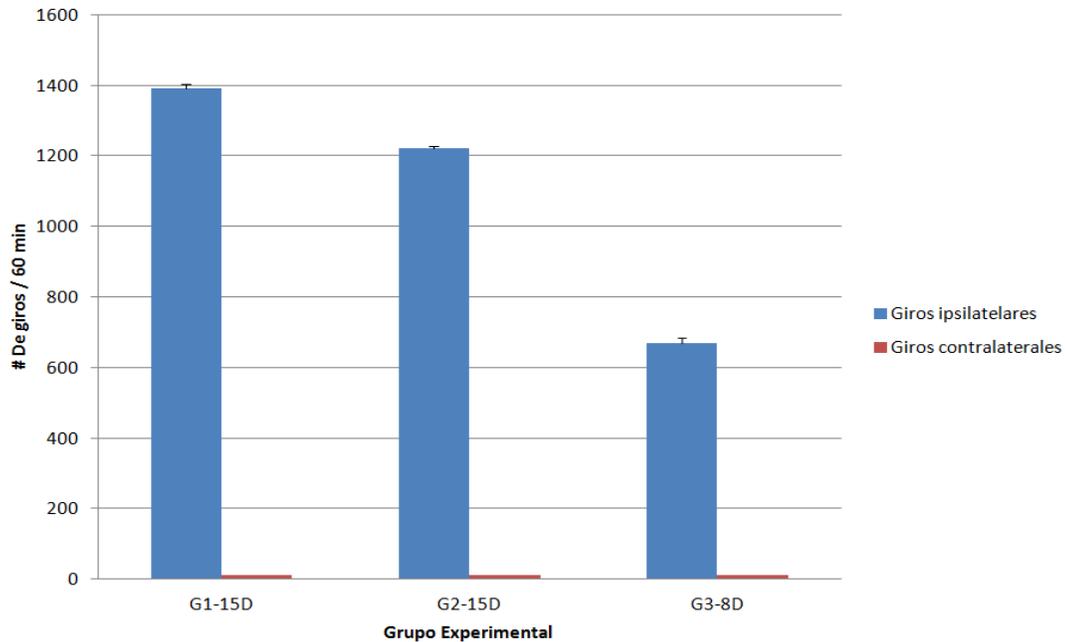
### **Análisis estadístico**

A los datos obtenidos del conteo de sobrevivencia y de co-localización se les aplicó la prueba de ANOVA de un factor y un análisis de Tukey como analisis *post hoc*.

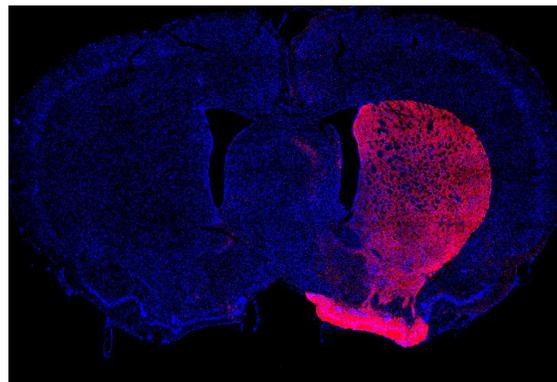
## Resultados

### Lesión

Se evaluaron conductualmente tres grupos de 10 ratas con lesión, los dos primeros 15 días después de realizar la inyección de la 6-OHDA (G1-15D y G2-15D), periodo óptimo para evaluar una rata como lesionada de acuerdo con la pérdida de células dopaminérgicas, el grupo restante fue sometido a la prueba conductual 8 días después de la inoculación (G1-8D) con el fin de conocer si el roedor se podía considerar lesionado al momento del trasplante (en cada grupo se incluyó uno o dos animales sin lesión como control). En los grupos G1-15D y G2-15D se observó una conducta de giro superior a los 33.3 giros ipsilaterales por minuto y superior a los 16.6 giros ipsilaterales por minuto en el grupo evaluado a los 8 días post-lesión [Gráfica 1]. Es sabido que la pérdida del 80% del suministro de dopamina al estriado provoca una conducta de giro de al menos 11.6 giros por minuto, por tanto, se concluyó que las ratas pueden considerarse lesionadas tanto a los 15 días y 8 días después de inyectar la toxina en la SNc. Sin embargo, los animales que fueron lesionados y 8 días después fueron trasplantadas, al no ser sometidos a una prueba conductual, se les evaluó a nivel histológico para corroborar la lesión, lo anterior se logró con el inmunomarcaje para TH, la TH es una enzima que se encuentra en la células neuronales de tipo dopaminérgicas y es la responsable de la hidroxilación de la tirosina para así ser convertida en DOPA y que más adelante se sintetizará a dopamina, el inmunomarcaje reveló así, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, los roedores que no presentaron la condición observada en la Fig. 6 fueron descartadas del experimento.



**Gráfica 1 Medición de giros ipsilaterales y contralaterales en prueba conductual inducida por anfetamina.** Los animales lesionados fueron sometidos a una prueba conductual para revelar su grado de lesión 15 y 8 días post-lesión. En la gráfica se observa que los giros ipsilaterales al hemisferio lesionado (azul) tuvieron un número mayor a 400, lo que nos permite considerarlos modelo de la EP tanto a los 15, que es lo comúnmente usado, como a los 8 días. Medias  $\pm$  error estándar de la media. n=10.

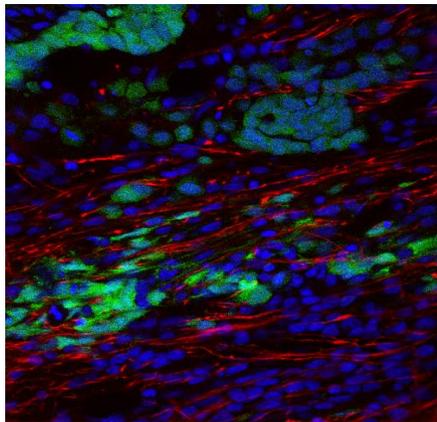


**Figura 6 Inmunofluorescencia para TH a nivel de estradiado.** Del lado derecho del cerebro se puede observar la marca positiva del inmunomarcaje para TH (rojo), mientras que en el lado izquierdo, el cual fue lesionado con la toxina 6-OHDA, no presenta la misma condición. Tomando en cuenta que la TH es una enzima involucrada en la síntesis de dopamina este experimento permite discriminar entre ratas debidamente lesionadas y las que no sufrieron neurodegeneración significativa causada por la neurotoxina (Azul: núcleos). Reconstrucción en mosaico con microscopía confocal. Aumento de 10x.

## Evaluación del trasplante de CE's

### Localización

Para evaluar que la colocación de las células trasplantadas estuviera en la zona correcta (SNc), se realizó el inmunomarcaje para TH en las rebanadas de tejido en las que empezaba a observarse el trasplante, basándonos en la señal de la proteína verde fluorescente; con lo que logramos verificar que nuestras células trasplantadas se encontraban inmersas entre las fibras dopaminérgicas de la SNc [fig. 7].



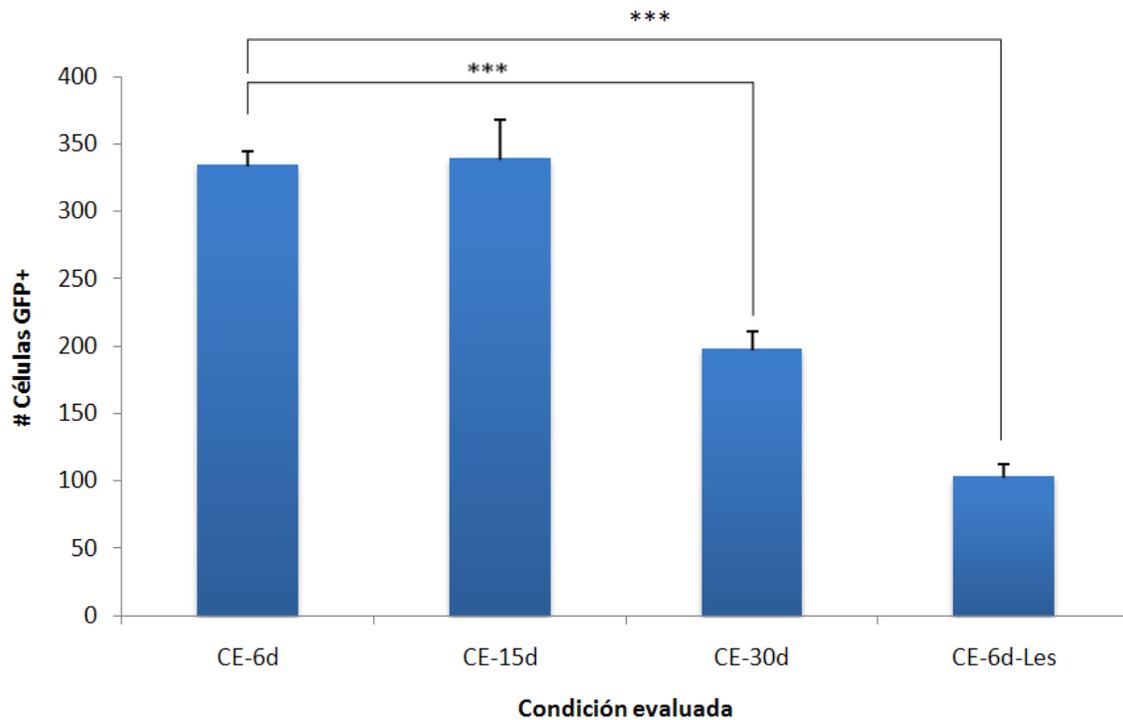
**Figura 7 Localización del trasplante en el tejido mesencefálico.** El tejido fue procesado por la técnica de inmunofluorescencia para revelar la presencia de TH (Rojo) y núcleos (azul). El trasplante (verde) fue colocado en las coordenadas para la SNc lo que se corroboró al encontrarlo inmerso entre las fibras dopaminérgicas de la SNc de un animal sin lesión. Plano sencillo de reconstrucción en plano de Z con microscopía confocal. Aumento 10x.

### Sobrevivencia

Dado que la línea celular R1B5 expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP), la sobrevivencia fue evaluada indirectamente por la señal positiva de la GFP en las células del CE [fig.8 A, B, C y D], cuando éstas degeneran, la marca de la proteína se torna a un color amarillo opaco y en algunas de ellas se pierde la totalmente, también, se observó que la sobrevivencia de las células trasplantadas en animales sin lesión es similar a los 6 y 15 días post-trasplante, sin embargo, a los 30 días existe una marcada reducción de casi el 50 % con respecto a lo

observado a los 6 días [Graf. 2]. Es importante mencionar que no se estimó la sobrevivencia total del trasplante.

El trasplante evaluado en animales con lesión fue viable solo cuando se observó a los 6 días y en comparación con los animales sin lesión la sobrevivencia se ve reducida hasta en un 60% [Graf. 2].



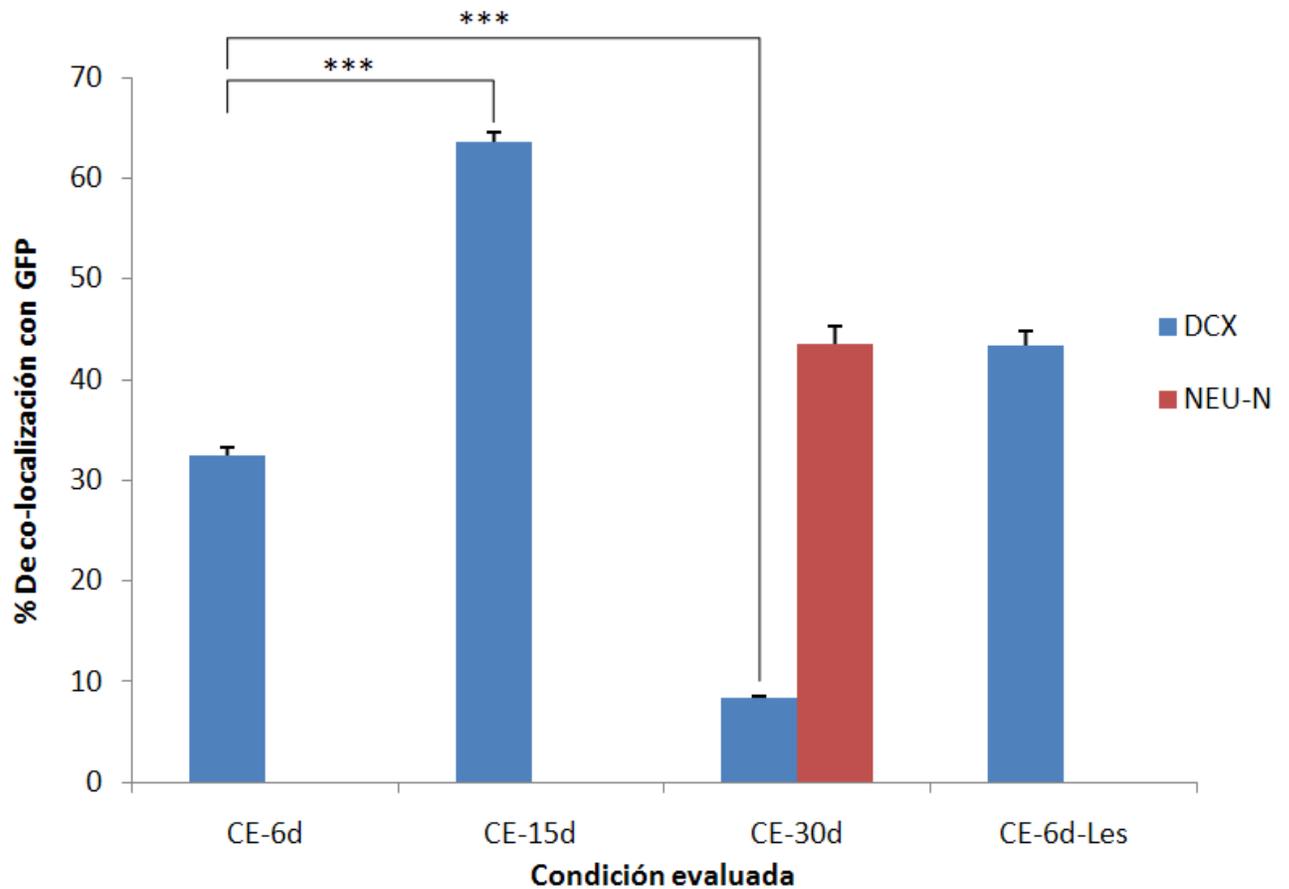
**Grafica 2 Relación de sobrevivencia de las células trasplantadas en distintos periodos y condiciones.** En la gráfica podemos observar el número de células promedio encontradas en un campo focal de microscopio con un aumento de 40X. Encontramos que el número de células a los 6 y 15 días post-trasplante en animales sin lesión es muy similar, mientras que ese número se reduce de manera considerable a los 30 días. En los animales con lesión, 6 días post-trasplante, hallamos una sobrevivencia menor a las 100 células por campo focal. La sobrevivencia del trasplante evaluado 15 y 30 días en animales con lesión fue nula. Medias  $\pm$  error estándar de la media \* $p < 0.05$  vs CE-6d (TUKEY). n=5.

### Diferenciación

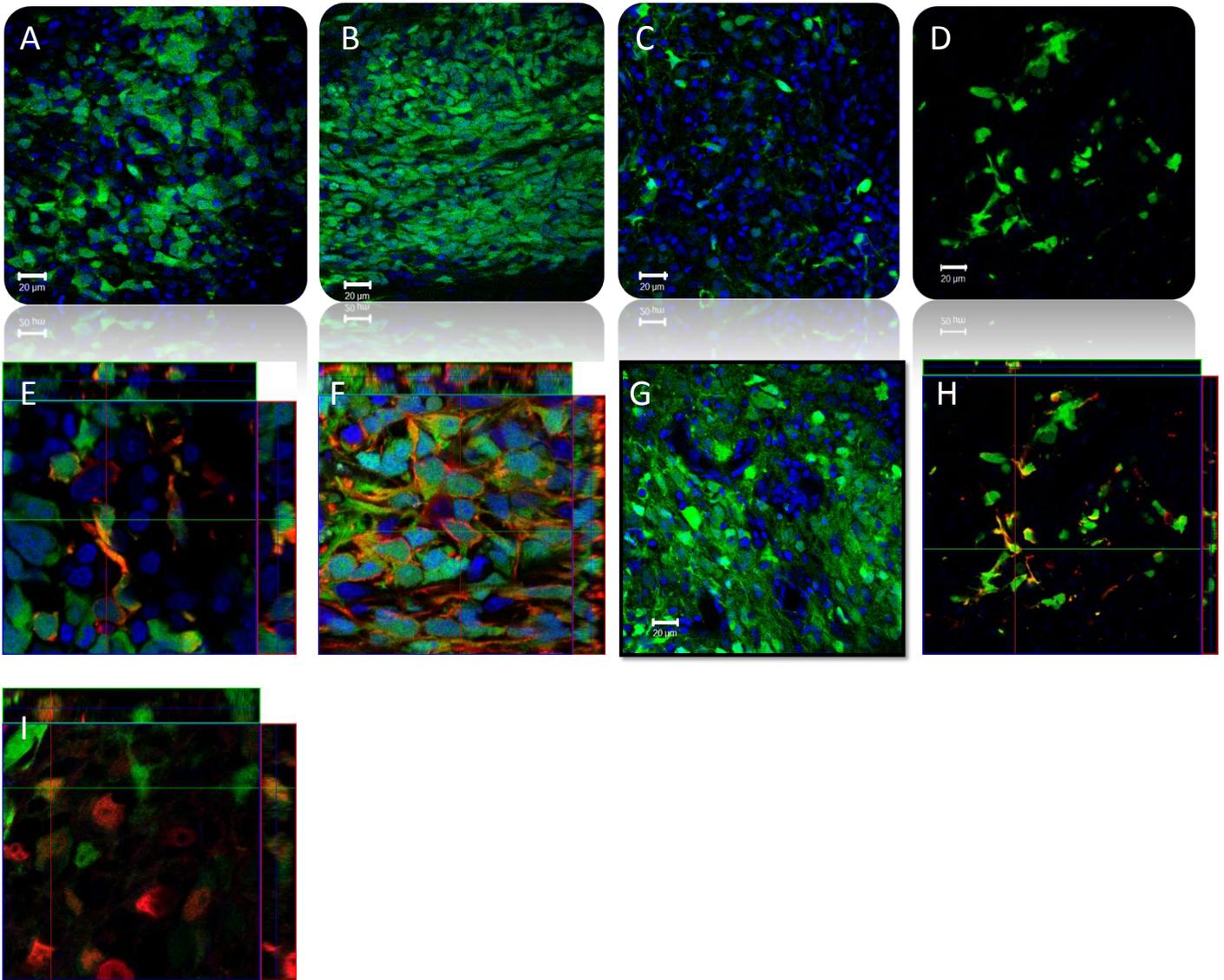
Con el fin de evaluar la diferenciación de las células del CE en la SNc, se realizó el inmunomarcaje para Doble cortina (DCX). DCX es una proteína que promueve la polimerización de microtúbulos

presente en neuroblastos tempranos y neuronas jóvenes. La expresión de DCX se encontró aproximadamente en el 30% de las células del CE evaluadas a 6 días en los animales sin lesión y este porcentaje se eleva hasta el 60% en las células evaluadas a 15 días [Fig.8 E y F], por último, en a los 30 días, la expresión de DCX se reduce a menos del 10%. Posteriormente se realizó el inmunomarcaje para NeuN. NeuN es observada en la mayoría de de las células neuronales del sistema nervioso con excepción de algunas poblaciones que se conocen como NeuN-negativas, NeuN es una proteína soluble localizada en el núcleo y citoplasma de células neuronales. La expresión de NeuN fue nula en las células evaluadas a 6 y 15 días en animales sin lesión, sin embargo a los 30 días se encontró expresión de NeuN en aproximadamente el 45% de las células de CE [Fig.8 I]. De igual forma se realizó el inmunomarcaje para Nestina (Nes) y para TH, sin embargo no se encontró la expresión de ninguno de ellos. La relación de marcaje se observa en la gráfica 3.

Las células de cuerpo embrioide trasplantadas en el modelo roedor de la EP tuvieron la capacidad de sobrevivir solo en el periodo de 6 días post-trasplante y en comparación con las células evaluadas en el mismo periodo pero en animales sin lesión el número de células se redujo a menos del 30%, sin embargo el porcentaje de marca DCX positiva aumentó un 15% [Graf. 3] [fig.8 H].



**Gráfica 3 Porcentaje de células trasplantadas en la SNc co-localizando con los marcadores específicos de diferenciación neuronal.** Ésta es una relación expresada en porcentaje de la co-localización de la proteína verde fluorescente de las células trasplantadas con la señal de los marcadores específicos usados para determinar el estado de diferenciación del trasplante. Encontramos que las células evaluadas a 6 días en animales con lesión, expresan la proteína DCX en un porcentaje cercano al 30%, mismo que se duplica a los 15 días, pero que tiene una reducción marcada a los 30 días. Por otra parte, el porcentaje de la co-localización de la misma proteína en el trasplante evaluado a los 6 días pero en animales con lesión es superior al 40%. La co-localización de la proteína Neu-N se encuentra expresada sólo en las células evaluadas en animales sin lesión 30 días post-trasplante en un porcentaje superior al 40%. Es de importancia notar que no encontramos la expresión de NES y TH. Medias  $\pm$  error estándar de la media, \* $p < 0.05$  vs CE-6d (TUKEY). n=5.



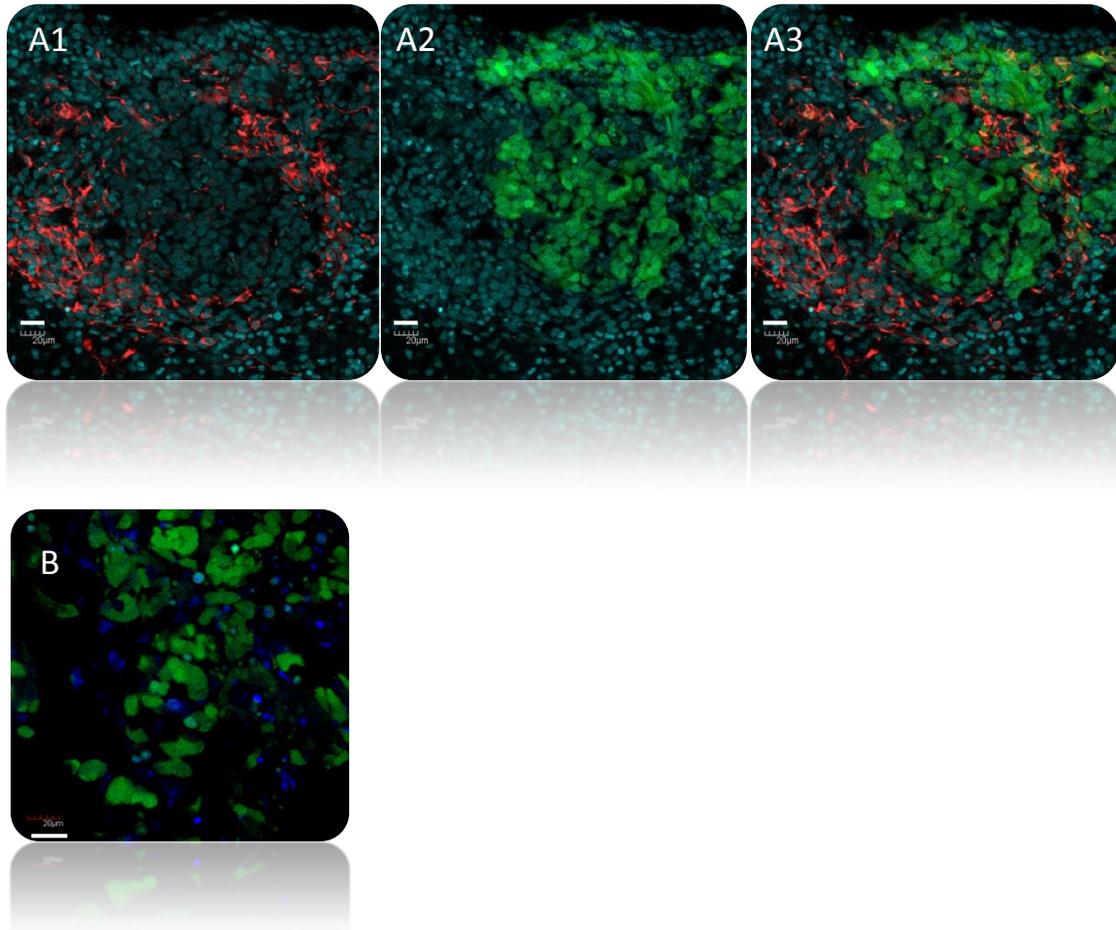
**FIGURA 8** Supervivencia y diferenciación del trasplante a nivel de la SNc. **(A-D)** Evaluación del trasplante de CEs 6, 15, 30, y 6+lesión, respectivamente. **(E, F y H)** Ortogonal de corroboración para la co-localización de DCX-GFP a 6, 15 y 6+lesión respectivamente, **(G)** trasplante a 30 días con nula expresión de DCX. **(I)** ortogonal de corroboración para Neu-N-GFP. Imágenes de microscopía confocal. A-C y G barra de escala 20μm, E, F e I aumento 40x, H aumento 10x.

### Controles

Las células de CE trasplantadas en el estriado de ratas sin lesión, tuvieron la capacidad de sobrevivir 15 días, sin embargo, no tuvieron la capacidad de diferenciarse a precursores neuronales como sucede en la SNc, determinado por la nula expresión observada de la proteína DCX que,

como se ha mencionado, está presente en células que posteriormente diferenciarán a neuronas funcionales (en condiciones fisiológicas normales) [fig. 8].

De forma similar las células trasplantadas en un estadio previo a la formación de los CE, las células troncales embrionarias, en animales sin lesión no co-localizaron con el marcador DCX.



**FIGURA 9** Controles: trasplante de EBs a nivel de estriado y Células troncales embrionarias en SNc. **(A1-A3)** Células de cuerpo embriode (verde) 15 días post trasplante a nivel de estriado. Las células no comienzan una diferenciación neuronal por la nula expresión del marcador DCX (ROJO) **(B)** Células troncales embrionarias (verde) a nivel de SNc evaluadas a los 15 días. No expresan la DCX; (barra de escala 20µm)(Azul núcleos).

## **Discusión:**

Las células troncales, se distinguen por su capacidad de auto-renovación y diferenciación a distintos tipos celulares especializados. Una de las características que permite a las células troncales poseer tales habilidades es la facultad que tienen para recibir e interpretar las señales de su entorno tanto *in vitro* como *in vivo*. Este tipo celular ha ganado importante atención en el campo de investigación clínica y básica, y por lo tanto, se ha pensado en la posibilidad de utilizarla como fuente celular en las terapias de reemplazo de distintos padecimientos incluyendo la enfermedad de Parkinson. En el presente trabajo demostramos que las células troncales embrionarias en un estado inicial de diferenciación (cuerpos embrioides) pueden recibir señales de inducción neural, además de sobrevivir al menos 30 días en el tejido mesencefálico de ratas adultas y que en ratas con lesión la sobrevivencia no sobrepasa los 6 días. Es importante enfatizar que de acuerdo con estos resultados se puede inferir que la SNC es una zona de inducción neuronal y por lo tanto en ella existen las señales que permiten a las células de los cuerpos embrioides iniciar un proceso de diferenciación hacia neuronas.

## **Sobrevivencia**

Como se ha descrito antes, la 6-OHDA es una molécula hidroxilada análoga de la dopamina que se internaliza en las células catecolaminérgicas y dopaminérgicas, usando para ello los transportadores dopaminérgicos y noradrenérgicos; una vez en el interior de las células tiene su efecto tóxico que conduce a la muerte celular. En nuestros experimentos, encontramos que la sobrevivencia del trasplante en animales lesionados está reducida hasta un 60% en comparación con los animales no lesionados (6 días) [Graf. 2]. Dado que hasta el momento no se ha reportado que las células indiferenciadas, como lo son las células troncales embrionarias o las células de los CEs, tengan la expresión de alguno de estos dos transportadores, es probable que las células trasplantadas estén degenerando, en los animales con daño, por falta de un soporte mecánico y/o por una reacción inmunológica (Alemdar, et al. 2007; Carpentier y Palmer, 2009; Uemura, et al., 2010).

La lesión en el SNC adulto de mamíferos es seguida por una serie de eventos celulares y moleculares muy complejos como respuesta al daño y con el fin de preservar la integridad celular en las regiones afectadas. Un fenómeno aunado a la falta de regeneración celular es el proceso de cavitación progresiva en la que, después de días o semanas, la lesión puede aumentar considerablemente de tamaño, lo que conduce a la formación de un espacio desprovisto de células o de matriz extracelular y, más adelante, en una cicatriz glial “encapsulada”. A largo plazo, la lesión resulta en una incapacidad funcional permanente, debido a que la mayoría de los axones o células dañadas no se regeneran (Fitch, et al., 1999). Uno de los problemas más recurrentes en

los experimentos de trasplante celular, tanto en modelos de daño y animales intactos, es la baja sobrevivencia. La mayor parte de la muerte celular ocurre durante los primeros días pos-trasplante como resultado de los procesos de inflamación o respuesta inmune, falta de factores adecuados, estrés oxidativo, excitotoxicidad, hipoxia y anoikis: tipo de muerte celular mediada por el desprendimiento de matriz extracelular y falta de vecindad con células del hospedero (Thonhoff, et al., 2008; Orive, et al., 2009; Uemura, et al., 2010).

La serie de procesos moleculares y celulares inherentes al daño cerebral provocado por la inoculación de la 6-OHDA, el rechazo inmunológico y la formación de un espacio desprovisto de células o matriz extracelular, entre otros fenómenos ya mencionados, explica la relativamente baja sobrevivencia del trasplante evaluado a los 6 días en animales lesionados y la nula sobrevivencia en cursos temporales mayores (15 y 30 días). El proceso de cavitación puede que esté aumentado en nuestro modelo de neurodegeneración en el cual se provoca la pérdida de una población de células muy focalizadas, región en la que se efectúa el trasplante. Por otro lado, al manejar el tejido de las ratas lesionadas, éste siempre se manifestó lábil en la zona de interés, quizá provocado por la doble acción mecánica sobre el sitio (inoculación de la toxina/trasplante) y la lesión *per sé*, además de que al ser analizado al microscopio, en todos los casos, se observó una cavitación.

Nuestro resultado en relación con la sobrevivencia [Graf. 2] difiere con lo reportado por Zhu y colaboradores en el 2009; ellos observan que las células troncales neurales pueden sobrevivir hasta 4 meses en el tejido encefálico de roedores modelos de la EP, sin embargo, no reportan el rango temporal transcurrido desde el momento de su lesión y el del trasplante, además de lo anterior, esta discordancia puede deberse a que el modelo de la EP es generado por un procedimiento distinto y el trasplante es colocado en una región distinta a la SNC. Es importante mencionar, además, que el experimento no lo realizan en animales sin daño, datos que permitirían discutir si la lesión tiene un efecto sobre el tipo celular y el grado de diferenciación que usaron.

Por otro lado, Björklund y colaboradores en el 2002 al trasplantar células derivadas de cuerpo embrioide en ratas inmunosuprimidas con ciclosporina y con lesión de 6-OHDA, a nivel de estriado y SNC, reportan una sobrevivencia de al menos 16 semanas en un porcentaje cercano al 50%. Una de las diferencias en relación con nuestro experimento, es que ellos llevan a cabo la lesión en el haz medial del cerebro medio lo que permite un menor daño mecánico en la zona del trasplante.

El trasplante que realizamos puede ser considerado interespecífico, al trasplantar células de una línea a de ratón en ratas, a diferencia del trasplante realizado por Zhu y el realizado por Björklund (rata/rata y ratón/ratón respectivamente). Esto es un factor importante al comparar la

sobrevivencia, ya que al ser un trasplante interespecífico la respuesta inmune es más severa sobre las células a diferencia de un trasplante inmunohistocompatible.

Era de interés conocer la influencia de la SNc, de animales lesionados y no lesionados, sobre el tipo celular usado, es por eso que el experimento se realizó sin incluir la inmunosupresión; además se ha reportado que el uso de los inmunosupresores como la ciclosporina, afectan la migración y la diferenciación de las células cuando estas son trasplantadas en estados inmaduros o indiferenciados (células troncales embrionarias o precursores neurales) (Guo, et al., 2007).

## **Diferenciación**

El presente estudio tuvo como antecedente el trabajo de Baizabal y Covarrubias publicado en el año del 2008, ellos realizaron el trasplante de células derivadas de cuerpos embrioides generados de la línea R1B5 en la línea media del mesencéfalo en explantes de ratón. El sitio en el cual colocaron las células es conocido como el de origen embrionario de las células dopaminérgicas del cerebro medio; ellos reportan que las células trasplantadas tienen la capacidad de reconocer las señales del sitio y diferenciar en casi un 70% a precursores dopaminérgicos y células dopaminérgicas.

La diferenciación *in vitro* de las células troncales embrionarias hacia diversos linajes es comúnmente iniciada mediante la formación de cuerpos embrioides. Los resultados obtenidos por Baizabal y Covarrubias, son evidencias claras de que los cuerpos embrioides responden al entorno neurogénico del mesencéfalo en etapas tempranas del desarrollo, y no así otros tipos celulares como los precursores neurales o células troncales embrionarias.

Nuestro trabajo reveló que el trasplante de células derivadas de los CEs es capaz de sobrevivir en la SNc de roedores adultos sin lesión al menos 30 días y que a los 6 días diferencian en un número alrededor del 30% a precursores neurales y a los 15 días aumenta a un 60%. También se encontró un número cercano al 40% de las células evaluadas a los 30 días expresando la proteína NeuN, misma que se encuentra sólo en neuronas maduras. En ningún caso se encontraron células diferenciadas a dopaminérgicas [Graf. 2 y 3].

Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso central existen señales específicas que permitirán la regionalización en la formación del cerebro. Estas señales serán determinantes en la

especificación de las distintas estructuras y por tanto de la amplia variedad de tipos celulares, al mismo tiempo que restringen progresivamente el número de subtipos neuronales y gliales que se pueden generar. Estas señales se encuentran en forma de factores transcripcionales que en consecuencia de la progresión del desarrollo se van perdiendo, y pueden re-expresarse en situaciones específicas como lo es un proceso de daño/reparación (Baizabal y Covarrubias, 2008). Nuestro resultado concuerda con la idea de que el cerebro adulto ha perdido las señales que permiten a las células en cuestión diferenciar en alto porcentaje a células dopaminérgicas.

Existe un trabajo publicado en el 2008 por Deacon y colaboradores, en el que después de colocar células troncales de ratón en estriado de ratas inmunosuprimidas y por debajo de la capsula renal de ratón, éstas se diferencian, al parecer, de forma aleatoria y en su mayoría a células positivas a TH, 5-hidroxitrotamina (5-HT) y GFAP (*glial fibrillary acid proteín*), marcadores que revelan la presencia de células dopaminérgicas, serotoninérgicas y gliales respectivamente. Ellos concluyen que las células tienen la capacidad de diferenciar a tipos neurales independientes al sitio-específico en el cual son colocadas. Sin embargo, ellos no muestran fotografías que respalden sus resultados de forma contundente, ya sea por una co-localización del marcador que usan para revelar la presencia de las células en el tejido con los marcadores específicos usados para evaluar su trasplante. Este resultado resalta su particularidad, al tomar en cuenta que el fenómeno no se observa cuando las células troncales embrionarias son cultivadas de forma prolongada y al ser trasplantadas en diversos sitios de animales experimentales, estas derivan en tumores muy heterogéneos en los que se incluyen muchos tipos celulares además del tipo neuronal. Por otro lado, Deacon menciona que es necesario realizar pruebas morfológicas adicionales además de funcionales con el fin de poder afirmar que las células en verdad poseen la identidad reportada.

Björklund y colaboradores en el 2002 al colocar células de cuerpo embrioide de ratón en el estriado de un modelo murino de la EP reportan una diferenciación de alrededor del 50 % a células dopaminérgicas con identidad mesencefálica. Lo anterior, incluso, restablece de manera progresiva la conducta motora. En el experimento reportan la sobrevivencia prolongada de las células al menos por 16 semanas. Ellos afirman que el tipo celular está comprometido a formar células TH+ sin la necesidad de una señal específica. Lamentablemente, nosotros no pudimos observar el comportamiento de las células en la cápsula renal, sin embargo, al colocarlas en el estriado las células no iniciaron un proceso de diferenciación como lo hicieron a nivel de la SNc[Fig. 9], además, Baizabal y Covarrubias, al igual que varios otros grupos de investigación, al cultivar los cuerpos embrioides por tiempos prolongados observan una amplia variedad de tipos celulares que pueden ir desde neuronas hasta células cardíacas contráctiles, refutando así la idea de una predisposición de diferenciación neuronal en las células de los CEs. Aunado a lo anterior, resultados generados por nuestro equipo de trabajo demuestran que las células de cuerpo embrioide colocadas en distintos sitios del sistema nervioso central, entre ellos la corteza, no

manifiestan el mismo comportamiento de diferenciación observado en la SNc (Maya-Espinosa, Datos no publicados).

### **Señales de inducción neuronal**

En la actualidad existe un debate entre la comunidad científica sobre si en la región de la SNc se llevan a cabo o no un proceso neurogénico. Hecho que sería de gran relevancia al ser el sitio donde reside una de las poblaciones más importantes de células dopaminérgicas en el cerebro adulto. Nuestros resultados nos permiten sugerir que en la SNc se encuentran señales necesarias de inducción neural y que las células de CE están capacitadas para recibir dichas señales. Lo anterior surge de la observación del trasplante de las células de CE en una zona distinta del cerebro de rata adulta como lo es el estriado. Se pudo observar que las células sobrevivían al menos 15 días pero no tuvieron el ambiente necesario para iniciar una diferenciación neural, lo mismo se observó en el trasplante de células troncales embrionarias en la SNc [Fig. 9]. Como se ha mencionado, los CEs son agregados tridimensionales de la forma simple de las células troncales embrionarias que recapitulan etapas tempranas del desarrollo embrionario, por tanto poseen cierto grado de diferenciación en distintos estratos (Rathjen y Rathjen, 2001), es posible que el grado de diferenciación de los cuerpos embrioides les confiera la capacidad de recibir e interpretar las señales del medio como se demostró en la línea media del mesencéfalo.

Una de las ideas que surge del resultado obtenido por Baizabal y Covarrubias, mismo que fue corroborado en el presente trabajo, en el que se afirma que la diferenciación de las células troncales embrionarias a células de cuerpo embrioides es necesaria para iniciar un proceso de diferenciación neuronal en respuesta a señales encontradas en el tejido encefálico, es que éste último tipo celular puede servir como sensor de nichos neurogénicos o de inducción neuronal en el sistema nervioso central.

## **Conclusiones**

Las células de cuerpo embriode pueden sobrevivir hasta 30 días en la SNc de animales sin lesión y sólo 6 días en animales lesionados con 6-OHDA, demostrando que la interacción del trasplante con células del hospedero es de importancia para promover la sobrevivencia de las células implantadas y que cuando el soporte mecánico es deficiente lo más probable es que las células trasplantadas degeneren.

Las células de cuerpo embriode son capaces de iniciar un proceso de diferenciación neuronal tanto en animales con lesión y animales sin lesión, en ésta última condición pueden llegar a formar neuronas maduras en un 40 %. De acuerdo con este resultado y lo observado en los trasplantes de CEs a nivel de estriado, se puede inferir que la SNc es una zona que permite la sobrevivencia de células derivadas de cuerpo embriode y que además existen en ella señales de inducción neuronal, mismas que son interpretadas por las células de los CEs.

## Referencias

- Agid, Y., Ahlskog, E., Albanese, A., Calne, D., Chase, T., De Yebenes, J., Factor, S., Fahn, S., Gershanik, O., Goetz, C., *et al.* (1999). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: a consensus meeting. *Mov Disord* *14*, 911-913.
- Ahlskog, J.E. (2001). Parkinson's disease: medical and surgical treatment. *Neurol Clin* *19*, 579-605, vi.
- Arjona, V., Minguéz-Castellanos, A., Montoro, R.J., Ortega, A., Escamilla, F., Toledo-Aral, J.J., Pardal, R., Mendez-Ferrer, S., Martín, J.M., Pérez, M., *et al.* (2003). Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* *53*, 321-328; discussion 328-330.
- Armstrong, R.J., Hurelbrink, C.B., Tyers, P., Ratcliffe, E.L., Richards, A., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., and Barker, R.A. (2002). The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* *175*, 98-111.
- Backlund, E.O., Granberg, P.O., Hamberger, B., Knutsson, E., Martensson, A., Sedvall, G., Seiger, A., and Olson, L. (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* *62*, 169-173.
- Baizabal, J.M., and Covarrubias, L. (2009). The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation. *Dev Biol* *325*, 49-59.
- Ben-Hur, T., Idelson, M., Khaner, H., Pera, M., Reinhartz, E., Itzik, A., and Reubinoff, B.E. (2004). Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells* *22*, 1246-1255.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* *19*, 180-192.
- Bjorklund, A., Dunnett, S.B., Brundin, P., Stoessl, A.J., Freed, C.R., Breeze, R.E., Levivier, M., Peschanski, M., Studer, L., and Barker, R. (2003). Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* *2*, 437-445.
- Bjorklund, A., and Stenevi, U. (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* *177*, 555-560.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., *et al.* (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2344-2349.
- Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C., and Vescovi, A.L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* *283*, 534-537.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., and Verna, J.M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* *65*, 135-172.
- Bosboom, J.L., Stoffers, D., and Wolters, E. (2004). Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm* *111*, 1303-1315.
- Bowen, F.P. (1976). Behavioral alterations in patients with basal ganglia lesions. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* *55*, 169-180.
- Braak, H., Rub, U., Gai, W.P., and Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* *110*, 517-536.

Bratt-Leal, A.M., Carpenedo, R.L., and McDevitt, T.C. (2009). Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog* 25, 43-51.

Brown, P., and Marsden, C.D. (1998). What do the basal ganglia do? *Lancet* 351, 1801-1804.

Brundin, P., Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Lindvall, O., Astedt, B., and Bjorklund, A. (1986). Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 65, 235-240.

Brustle, O., Spiro, A.C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., and McKay, R.D. (1997). In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14809-14814.

Buu, N.T. (1993). Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium and dopamine in the mouse brain cell nuclei. *J Neurochem* 61, 1557-1560.

Cadet, J.L., and Brannock, C. (1998). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* 32, 117-131.

Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11, 490-493.

Cohen, G. (1984). Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5, 77-82.

Connor, B., and Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* 27, 1-39.

Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., *et al.* (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3, e283.

Cooper, I.S. (1953). Ligation of the anterior choroidal artery for involuntary movements; parkinsonism. *Psychiatr Q* 27, 317-319.

Chase, T.N., Woods, A.C., and Glaubiger, G.A. (1974). Parkinson disease treated with a suspected dopamine receptor agonist. *Arch Neurol* 30, 383-386.

Cho, M.S., Lee, Y.E., Kim, J.Y., Chung, S., Cho, Y.H., Kim, D.S., Kang, S.M., Lee, H., Kim, M.H., Kim, J.H., *et al.* (2008). Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3392-3397.

Choi, W.S., Yoon, S.Y., Oh, T.H., Choi, E.J., O'Malley, K.L., and Oh, Y.J. (1999). Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP<sup>+</sup>-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res* 57, 86-94.

Date, I., Miyoshi, Y., Imaoka, T., Furuta, T., Asari, S., and Ohmoto, T. (1994). Efficacy of pretransection of peripheral nerve for promoting the survival of cogenerated chromaffin cells and recovery of host dopaminergic fibers in animal models of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 20, 213-221.

Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.

Davis, A.A., and Temple, S. (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372, 263-266.

de Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5, 525-535.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney, D., Kassissieh, S., Dempsey, P., *et al.* (1997). Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med* 3, 350-353.

Deacon, T.W., Pakzaban, P., Burns, L.H., Dinsmore, J., and Isacson, O. (1994). Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats. *Exp Neurol* 130, 151-167.

Desbaillets, I., Ziegler, U., Groscurth, P., and Gassmann, M. (2000). Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 85, 645-651.

Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., *et al.* (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113, 1701-1710.

Dobrossy, M., Busse, M., Piroth, T., Rosser, A., Dunnett, S., and Nikkhah, G. (2010). Neurorehabilitation With Neural Transplantation. *Neurorehabil Neural Repair*.

Doudet, D.J., Cornfeldt, M.L., Honey, C.R., Schweikert, A.W., and Allen, R.C. (2004). PET imaging of implanted human retinal pigment epithelial cells in the MPTP-induced primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 189, 361-368.

Drucker-Colin, R., Madrazo, I., Ostrosky-Solis, F., Shkurovich, M., Franco, R., and Torres, C. (1988). Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Prog Brain Res* 78, 567-574.

Dunnett, S.B., Bjorklund, A., Schmidt, R.H., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1983). Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites. *Acta Physiol Scand Suppl* 522, 29-37.

Dunnett, S.B., Bjorklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1981a). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res* 215, 147-161.

Dunnett, S.B., Bjorklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1981b). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. II. Bilateral lesions. *Brain Res* 229, 457-470.

Dunnett, S.B., Bjorklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1981c). Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 229, 209-217.

Espejo, E.F., Montoro, R.J., Armengol, J.A., and Lopez-Barneo, J. (1998). Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron* 20, 197-206.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Fink, J.S., Schumacher, J.M., Elias, S.L., Palmer, E.P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H.S., *et al.* (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 9, 273-278.

Freed, C.R., Breeze, R.E., Rosenberg, N.L., Schneck, S.A., Kriek, E., Qi, J.X., Lone, T., Zhang, Y.B., Snyder, J.A., Wells, T.H., *et al.* (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 327, 1549-1555.

Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., *et al.* (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344, 710-719.

Freed, W.J., Cannon-Spoor, H.E., and Krauthamer, E. (1986). Intrastriatal adrenal medulla grafts in rats. Long-term survival and behavioral effects. *J Neurosurg* 65, 664-670.

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

Freed, W.J., Poltorak, M., and Becker, J.B. (1990). Intracerebral adrenal medulla grafts: a review. *Exp Neurol* 110, 139-166.

Freund, T.F., Bolam, J.P., Bjorklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., Powell, J.F., and Smith, A.D. (1985). Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5, 603-616.

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.

Gasser, T. (1998). Genetics of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44, S53-57.

Gerfen, C.R., Keefe, K.A., and Gauda, E.B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci* 15, 8167-8176.

Gerrard, L., Rodgers, L., and Cui, W. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells* 23, 1234-1241.

Giladi, N., Kao, R., and Fahn, S. (1997). Freezing phenomenon in patients with parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 12, 302-305.

Goetz, C.G., Olanow, C.W., Koller, W.C., Penn, R.D., Cahill, D., Morantz, R., Stebbins, G., Tanner, C.M., Klawans, H.L., and Shannon, K.M. (1989). Multicenter study of autologous adrenal medullary transplantation to the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 320, 337-341.

Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8, 481-488.

Grossman, M., Carvell, S., Stern, M.B., Gollomp, S., and Hurtig, H.I. (1992). Sentence comprehension in Parkinson's disease: the role of attention and memory. *Brain Lang* 42, 347-384.

Hauser, R.A., Freeman, T.B., Snow, B.J., Nauert, M., Gauger, L., Kordower, J.H., and Olanow, C.W. (1999). Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* 56, 179-187.

Hely, M.A., Morris, J.G., Reid, W.G., O'Sullivan, D.J., Williamson, P.M., Rail, D., Broe, G.A., and Margrie, S. (1994). The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 903-910.

Horiguchi, S., Takahashi, J., Kishi, Y., Morizane, A., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Tsuji, M., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., *et al.* (2004). Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J Neurosci Res* 75, 817-824.

Hornykiewicz, O. (2006). The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*, 9-15.

Horvath, M., Pasztor, E., Palkovits, M., Solyom, A., Tarczy, M., Lekka, N., and Csanda, E. (1990). Autotransplantation of superior cervical ganglion to the caudate nucleus in three patients with Parkinson's disease (preliminary report). *Neurosurg Rev* 13, 119-122.

Howel, L.L., Byrd, L.D., McDonough, A.M., Iuvone, P.M., and Bakay, R.A. (2000). Behavioral evaluation of hemiparkinsonian MPTP monkeys following dopamine pharmacological manipulation and adrenal co-graft transplantation. *Cell Transplant* 9, 609-622.

Hurelbrink, C.B., Armstrong, R.J., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., and Barker, R.A. (2002). Neural cells from primary human striatal xenografts migrate extensively in the adult rat CNS. *Eur J Neurosci* 15, 1255-1266.

Hurtig, H., Joyce, J., Sladek, J.R., Jr., and Trojanowski, J.Q. (1989). Postmortem analysis of adrenal-medulla-to-caudate autograft in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 25, 607-614.

Hurtig, H.I. (1980). Anticholinergics for Parkinson disease. *Ann Neurol* 7, 495.

Iacovitti, L., Donaldson, A.E., Marshall, C.E., Suon, S., and Yang, M. (2007). A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: Studies in vitro and in vivo. *Brain Res* 1127, 19-25.

Isacson, O., Deacon, T.W., Pakzaban, P., Galpern, W.R., Dinsmore, J., and Burns, L.H. (1995). Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med* 1, 1189-1194.

Itakura, T., Komai, N., Ryujin, Y., Ooiwa, Y., Nakai, M., and Yasui, M. (1994). Autologous transplantation of the cervical sympathetic ganglion into the parkinsonian brain: case report. *Neurosurgery* 35, 155-157; discussion 157-158.

Itakura, T., Uematsu, Y., Nakao, N., Nakai, E., and Nakai, K. (1997). Transplantation of autologous sympathetic ganglion into the brain with Parkinson's disease. Long-term follow-up of 35 cases. *Stereotact Funct Neurosurg* 69, 112-115.

Jenner, P., and Olanow, C.W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47, S161-170.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

Kapp, W. (1992). The history of drugs for the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 38, 1-6.

Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., *et al.* (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50-56.

Kim, S., Honmou, O., Kato, K., Nonaka, T., Houkin, K., Hamada, H., and Kocsis, J.D. (2006). Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res* 1123, 27-33.

Kopin, I.J. (1992). Features of the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Ann N Y Acad Sci* 648, 96-104.

Kordower, J.H., Cochran, E., Penn, R.D., and Goetz, C.G. (1991). Putative chromaffin cell survival and enhanced host-derived TH-fiber innervation following a functional adrenal medulla autograft for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 29, 405-412.

Kordower, J.H., Rosenstein, J.M., Collier, T.J., Burke, M.A., Chen, E.Y., Li, J.M., Martel, L., Levey, A.E., Mufson, E.J., Freeman, T.B., *et al.* (1996). Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 370, 203-230.

Laitinen, L.V., Bergenheim, A.T., and Hariz, M.I. (1992). Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg* 76, 53-61.

Lamberti, P., Armenise, S., Castaldo, V., de Mari, M., Iliceto, G., Tronci, P., and Serlenga, L. (1997). Freezing gait in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 38, 297-301.

Lecht, S., Haroutiunian, S., Hoffman, A., and Lazarovici, P. (2007). Rasagiline - a novel MAO B inhibitor in Parkinson's disease therapy. *Ther Clin Risk Manag* 3, 467-474.

Leenders, K.L., Palmer, A.J., Quinn, N., Clark, J.C., Firnau, G., Garnett, E.S., Nahmias, C., Jones, T., and Marsden, C.D. (1986). Brain dopamine metabolism in patients with Parkinson's disease measured with positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49, 853-860.

Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., and Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 8, 971-974.

Lie, D.C., Dzieczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W., and Gage, F.H. (2002). The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22, 6639-6649.

Lindvall, O., Backlund, E.O., Farde, L., Sedvall, G., Freedman, R., Hoffer, B., Nobin, A., Seiger, A., and Olson, L. (1987). Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann Neurol* 22, 457-468.

Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., *et al.* (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574-577.

Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Bjorklund, A., Leenders, K.L., Rothwell, J.C., *et al.* (1989). Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 46, 615-631.

Lindvall, O., Sawle, G., Widner, H., Rothwell, J.C., Bjorklund, A., Brooks, D., Brundin, P., Frackowiak, R., Marsden, C.D., Odin, P., *et al.* (1994). Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35, 172-180.

Luquin, M.R., Montoro, R.J., Guillen, J., Saldise, L., Insausti, R., Del Rio, J., and Lopez-Barneo, J. (1999). Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 22, 743-750.

Luthman, J., Fredriksson, A., Sundstrom, E., Jonsson, G., and Archer, T. (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33, 267-277.

Madrazo, I., Drucker-Colin, R., Diaz, V., Martinez-Mata, J., Torres, C., and Becerril, J.J. (1987). Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* 316, 831-834.

Madrazo, I., Leon, V., Torres, C., Aguilera, M.C., Varela, G., Alvarez, F., Fraga, A., Drucker-Colin, R., Ostrosky, F., Skurovich, M., *et al.* (1988). Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 318, 51.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

Mathisen, P.M. (2003). Gene discovery and validation for neurodegenerative diseases. *Drug Discov Today* 8, 39-46.

McGregor, K.H., Gil, J., and Lahiri, S. (1984). A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 57, 1430-1438.

McKay, B.S., Goodman, B., Falk, T., and Sherman, S.J. (2006). Retinal pigment epithelial cell transplantation could provide trophic support in Parkinson's disease: results from an in vitro model system. *Exp Neurol* 201, 234-243.

Minguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G.R., Toledo-Aral, J.J., Ortega-Moreno, A., Mendez-Ferrer, S., Martin-Linares, J.M., Katati, M.J., Mir, P., Villadiego, J., *et al.* (2007). Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 825-831.

Morihisa, J.M., Nakamura, R.K., Freed, W.J., Mishkin, M., and Wyatt, R.J. (1987). Transplantation techniques and the survival of adrenal medulla autografts in the primate brain. *Ann N Y Acad Sci* 495, 599-605.

Nakao, N., Kakishita, K., Uematsu, Y., Yoshimasu, T., Bessho, T., Nakai, K., Naito, Y., and Itakura, T. (2001). Enhancement of the response to levodopa therapy after intrastriatal transplantation of autologous sympathetic neurons in patients with Parkinson disease. *J Neurosurg* 95, 275-284.

Nakao, N., Shintani-Mizushima, A., Kakishita, K., and Itakura, T. (2004). The ability of grafted human sympathetic neurons to synthesize and store dopamine: a potential mechanism for the clinical effect of sympathetic neuron autografts in patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol* 188, 65-73.

Nieuwboer, A., Feys, P., de Weerd, W., and Dom, R. (1997). Is using a cue the clue to the treatment of freezing in Parkinson's disease? *Physiother Res Int* 2, 125-132; discussion 133-124.

Olanow, C.W., Freeman, T., and Kordower, J. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 345, 146; author reply 147.

Olanow, C.W., Koller, W., Goetz, C.G., Stebbins, G.T., Cahill, D.W., Gauger, L.L., Morantz, R., Penn, R.D., Tanner, C.M., Klawans, H.L., *et al.* (1990). Autologous transplantation of adrenal medulla in Parkinson's disease. 18-month results. *Arch Neurol* 47, 1286-1289.

Olson, L., Backlund, E.O., Ebendal, T., Freedman, R., Hamberger, B., Hansson, P., Hoffer, B., Lindblom, U., Meyerson, B., Stromberg, I., *et al.* (1991). Intraputamenal infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson's disease. One-year follow-up of first clinical trial. *Arch Neurol* 48, 373-381.

Padiglia, A., Medda, R., Lorrain, A., Biggio, G., Sanna, E., and Floris, G. (1997). Modulation of 6-hydroxydopamine oxidation by various proteins. *Biochem Pharmacol* 53, 1065-1068.

Pahwa, R., Wilkinson, S., Smith, D., Lyons, K., Miyawaki, E., and Koller, W.C. (1997). High-frequency stimulation of the globus pallidus for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 49, 249-253.

Park, C.H., Minn, Y.K., Lee, J.Y., Choi, D.H., Chang, M.Y., Shim, J.W., Ko, J.Y., Koh, H.C., Kang, M.J., Kang, J.S., *et al.* (2005). In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J Neurochem* 92, 1265-1276.

Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14, 223-236; discussion 222.

Perlow, M.J., Freed, W.J., Hoffer, B.J., Seiger, A., Olson, L., and Wyatt, R.J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204, 643-647.

Piccini, P., Brooks, D.J., Bjorklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehnström, S., Widner, H., *et al.* (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2, 1137-1140.

Piccini, P., Lindvall, O., Bjorklund, A., Brundin, P., Hagell, P., Ceravolo, R., Oertel, W., Quinn, N., Samuel, M., Rehnström, S., *et al.* (2000). Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 48, 689-695.

Przuntek, H., Müller, T., and Riederer, P. (2004). Diagnostic staging of Parkinson's disease: conceptual aspects. *J Neural Transm* 111, 201-216.

Rathjen, J., and Rathjen, P.D. (2001). Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev* 11, 587-594.

Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134-1140.

Rodolfa, K.T., and Eggan, K. (2006). A transcriptional logic for nuclear reprogramming. *Cell* 126, 652-655.

Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F., and Goldman, S.A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12, 1259-1268.

Sayles, M., Jain, M., and Barker, R.A. (2004). The cellular repair of the brain in Parkinson's disease--past, present and future. *Transl Immunol* 12, 321-342.

Schapira, A.H., Mann, V.M., Cooper, J.M., Krige, D., Jenner, P.J., and Marsden, C.D. (1992). Mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32 Suppl, S116-124.

Simola, N., Morelli, M., and Carta, A.R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 11, 151-167.

Studer, L., Tabar, V., and McKay, R.D. (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* *1*, 290-295.

Subramanian, T., Marchionini, D., Potter, E.M., and Cornfeldt, M.L. (2002). Striatal xenotransplantation of human retinal pigment epithelial cells attached to microcarriers in hemiparkinsonian rats ameliorates behavioral deficits without provoking a host immune response. *Cell Transplant* *11*, 207-214.

Svennilson, E., Torvik, A., Lowe, R., and Leksell, L. (1960). Treatment of parkinsonism by stereotatic thermolesions in the pallidal region. A clinical evaluation of 81 cases. *Acta Psychiatr Scand* *35*, 358-377.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.

Tanner, C.M., and Goldman, S.M. (1996). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* *14*, 317-335.

Tanner, C.M., Ottman, R., Goldman, S.M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., and Langston, J.W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* *281*, 341-346.

Taylor, A.E., Saint-Cyr, J.A., and Lang, A.E. (1986a). Frontal lobe dysfunction in Parkinson's disease. The cortical focus of neostriatal outflow. *Brain* *109* ( Pt 5), 845-883.

Taylor, A.E., Saint-Cyr, J.A., Lang, A.E., and Kenny, F.T. (1986b). Parkinson's disease and depression. A critical re-evaluation. *Brain* *109* ( Pt 2), 279-292.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.

Toledo-Aral, J.J., Mendez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarria, M., and Lopez-Barneo, J. (2003). Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* *23*, 141-148.

Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* *5*, 107-110.

Ungerstedt, U., and Arbuthnott, G.W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* *24*, 485-493.

Wernig, M., Zhao, J.P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 5856-5861.

Victorin, K., Brundin, P., Gustavii, B., Lindvall, O., and Bjorklund, A. (1990). Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts. *Nature* *347*, 556-558.

Wilson, S.I., and Edlund, T. (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* *4* *Suppl*, 1161-1168.

Williams-Gray, C.H., Foltynie, T., Lewis, S.J., and Barker, R.A. (2006). Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs* *20*, 477-505.

Yang, D., Zhang, Z.J., Oldenburg, M., Ayala, M., and Zhang, S.C. (2008). Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells* *26*, 55-63.

Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* *21*, 183-186.

Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 1129-1133.

Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R.M., Johansson, C.B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J., and Janson, A.M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7925-7930.

Zhu, Q., Ma, J., Yu, L., and Yuan, C. (2009). Grafted neural stem cells migrate to substantia nigra and improve behavior in Parkinsonian rats. *Neurosci Lett* *462*, 213-218.

Zigova, T., Pencea, V., Betarbet, R., Wiegand, S.J., Alexander, C., Bakay, R.A., and Luskin, M.B. (1998). Neuronal progenitor cells of the neonatal subventricular zone differentiate and disperse following transplantation into the adult rat striatum. *Cell Transplant* *7*, 137-156.