



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

**Terapia de reemplazo celular en ratas
neonatas carentes de neuronas
dopaminérgicas**

TESIS

Para obtener el grado académico de:

Biólogo

PRESENTA:

Oscar Alejandro Carballo Molina

Coautor: N. Emmanuel Díaz Martínez

Director de Tesis:

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo mi carrera.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en donde adquirí conocimientos valiosos tanto para mi formación académica como personal.

A mi jurado por sus comentarios constructivos para la realización del presente trabajo:

Dr. J. Iván Velasco Velázquez

Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

Dra. María Rosa Ávila Costa

Dedico esta tesis:

A la persona más importante en mi vida, mi mamá, quién me ha apoyado durante toda la vida en todos mis proyectos académicos y deportivos, animándome a no rendirme ante las adversidades y me enseñó que si uno se esfuerza puede conseguir cualquier meta planteada. A pesar de los problemas que mi madre ha enfrentado se ha mantenido de pie y me ha dado el ejemplo de nunca darme por vencido.

A mi hermanita por su cariño, por su espontaneidad y alegría, por ser quien en ocasiones con su ternura pone felicidad en la familia. Por su carácter inquebrantable y sus ganas constantes de seguir adelante.

A mi padre por el apoyo brindado y todas las cosas buenas que me ha enseñado.

A mi novia quién ha cambiado completamente mi vida, por haberme enseñado tanto y hacer de mí sin duda una mejor persona desde que la conocí.

A mis primos en Chiapas por compartir tantos bellos momentos, gracias a ellos pase una infancia muy feliz.

A todos mis amigos de Chiapas por tantos buenos momentos quienes si nombrara uno por uno abarcaría muchísimas páginas. Les agradezco por su apoyo incondicional y que a pesar de la distancia siguen manteniendo una muy buena amistad con migo.

A mis amigos en el Distrito Federal, tanto de la carrera como de otros lugares por haberme apoyado y por tantos buenos momentos.

Al Dr. J. Iván Velasco quién me brindó la oportunidad de entrar a su grupo de investigación y el apoyo que dió para realizar mí proyecto de investigación sin restricción alguna. Además de las múltiples enseñanzas brindadas.

Al Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez que me ha brindado un apoyo académico imprescindible en mí formación académica, por haberme enseñado las técnicas necesarias para llevar a cabo el presente trabajo.

Al Dr. Julio Cáceres Cortés con quién conocí el mundo de la investigación científica y cuando cualquier otro investigador no hubiera dado la oportunidad a un alumno recién ingresado a la carrera el sí lo hizo, y con ello incentivó en mí el gusto por la investigación.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Dedicación.....	ii
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Desarrollo de Neuronas Dopaminérgicas Mescencefálicas.....	2
Factores involucrados en el desarrollo temprano del cerebro medio.....	2
Factores que intervienen en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.....	3
Desarrollo axonal dopaminérgico mesencefálico.....	6
Sistema dopaminérgico.....	8
Vías dopaminérgicas.....	8
Distintas poblaciones en el cerebro.....	8
Ganglios Basales.....	9
Fisiología de los Ganglios basales.....	9
Vía directa e indirecta.....	10
Enfermedad de Parkinson.....	13
Características neuropatológicas de la EP.....	14
Etiología de la EP.....	15
Aproximaciones terapéuticas de la EP.....	16
Terapia de reemplazo celular.....	18
Protocolo de diferenciación de NDAs de la SNC a partir de células troncales embrionarias.....	20
Modelos experimentales de la EP.....	21

Modelo 6-OHDA.....	22
Modelo neonatal de la EP.....	23
ANTECEDENTES.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	34
Lesión.....	34
Protocolo de diferenciación.....	35
Trasplante.....	37
Pruebas conductuales de actividad espontánea en campo abierto.....	40
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	56
APÉNDICE.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AP	Antero-Posterior
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CTE	Células Troncales
COMT	Cateclo-o-aminotransferasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DV	Dorso-ventral
EBs	Cuerpos embrioides
En1	Engrailed homeobox 1
En2	Engrailed homeobox 2
EP	Enfermedad de Parkinson
EphB1	EPH receptor B1
FGF8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
FoxA2	Forkhead box A2
G	Gauches
GBX2	Gastrulation brain homeobox 2
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
Hes	Hairy and enhancer of split
Hnf3α	Hepatocyte Nuclear Factor 3 α Gene

Hnf3β	Hepatocyte Nuclear Factor 3 β Gene
LIF	Factor inhibidor de leucemia
Lmx1B	LIM homeobox transcription factor 1, beta
MHB	Midhindbrain boundary
ML	Medio-lateral
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAT	Transportador de noradrenalina
NDA s	Neuronas dopaminérgicas
Nurr1	Nuclear receptor related 1
Otx1	Orthodenticle homeobox 1
Otx2	Orthodenticle homeobox 2
Pax2	Paired box 2
Pax5	Paired box 5
Pax6	Paired box 6
Pitx3	Paired-like homeodomain transcription factor 3
RNA m	Ácido ribonucleico mensajero
SEM	Error estándar de la media
SN	Sustantia Nigra
SNc	Sustancia nigra pars compacta
Shh	Sonic hedgehog
TH	Tirosina Hidroxilasa
TGF	Factor transformante
Va	Ventral anterior
VI	Ventral lateral
VMAT-2	Transportador vesicular de monoaminas 2
Wnt1	Wingless type MMTV integration site family, member 1

Wnt3 Wingless type MMTV integration site family, member 3

Wnt5 Wingless type MMTV integration site family, member 5

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas (NDA) localizadas en la sustancia nigra (SN). El modelo animal más utilizado para el estudio de la EP es el de ratas adultas lesionadas unilateralmente con la neurotoxina 6-hidroxdopamina (6-OHDA), la que causa una degeneración selectiva de las NDA. Recientemente se ha planteado el uso de la terapia de reemplazo celular basada en células diferenciadas a partir de células troncales (CT) como una alternativa a los tratamientos actuales que han demostrado no ser eficaces y tener severos efectos secundarios. Se ha reportado que el cerebro neonatal presenta un mayor crecimiento axonal y supervivencia neuronal post-trasplante. Sin embargo trabajos previos en ratas neonatas únicamente han utilizado tejido fetal mesencefálico como fuente celular del trasplante, es por ello que en el presente trabajo tiene como objetivo evaluar si el ambiente de un cerebro joven repercute en el trasplante de NDA derivadas de un protocolo de diferenciación en contraste a lo reportado en cerebro adulto. Para ello se diferenciaron *in vitro* CT embrionarias de ratón a NDA, se lesionaron bilateralmente al día 1 postnatal (P1) con 6-OHDA y posteriormente se trasplantaron al día P3 con las células derivadas del protocolo de diferenciación. Los animales fueron evaluados conductualmente mediante una cámara de actividad espontánea para determinar si estos presentaban una conducta asociada a la lesión (hiperactividad), así como si los animales trasplantados presentaban una recuperación. Para ello se evaluaron diversos parámetros de la actividad locomotora espontánea, encontrándose una mejoría conductual en los animales trasplantados, con respecto a los animales control. Se corroboró la presencia y localización de las células trasplantadas mediante inmunohistoquímicas para la enzima limitante en la síntesis de dopamina, la Tirosina Hidroxilasa, y para la proteína M2 que identifica a células de ratón, observándose que las células migraron a distintas regiones del cerebro. Estos datos sugieren que el ambiente de un cerebro joven promueve que las NDA trasplantadas provenientes de un protocolo de diferenciación favorezcan la recuperación de las alteraciones motoras causadas por la lesión en animales jóvenes.

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo de Neuronas Dopaminérgicas Mesencefálicas

1.1 Factores involucrados en el desarrollo temprano del cerebro medio

Los precursores de las regiones encefálicas se forman como resultado de movimientos morfogenéticos que doblan, pliegan y contraen el tubo neural (revisado en Purves et al., 2007). La región anterior del tubo neural sufre cambios drásticos, en ella se forman tres vesículas primarias: cerebro anterior o proscencéfalo, cerebro medio o mesencéfalo y cerebro posterior o rombencéfalo. Posteriormente estas vesículas se subdividen y forman vesículas secundarias que a su vez darán origen a distintas estructuras en el organismo adulto como se puede observar en la Figura 1.

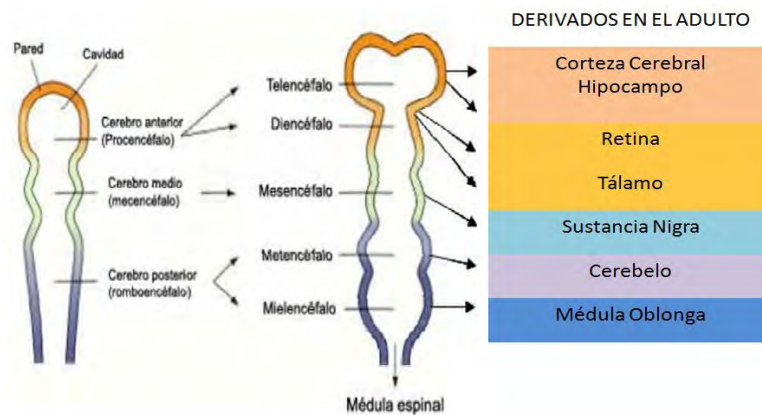


Figura 1. Desarrollo temprano del cerebro en humanos. Se muestran las subdivisiones de las tres vesículas primarias y las estructuras que de estas se forman en la etapa adulta (Tomado de Gilbert, 2003).

En el cerebro medio se llevan a cabo procesos fundamentales del desarrollo embrionario, uno de estos procesos es la generación de las neuronas dopaminérgicas las cuales forman distintos sistemas de conexión en el cerebro adulto y participarán en diversas funciones como la regulación de movimientos, procesos cognoscitivos, en la percepción, entre otras (Jankovic et al., 2005).

La especificación del mesencéfalo o cerebro medio depende ampliamente de la inducción proveniente del itsmo, una estructura adyacente al cerebro medio. Cualquier alteración en esta estructura conduce a serios defectos en el desarrollo del mesencéfalo. El itsmo se divide en una región ventral y en otra dorsal, el desarrollo de cada región implica diferentes cascadas de señalización. Una importante molécula en la inducción de la región ventral es sonic hedgehog (Shh), la cual es secretada por la notocorda y la placa del piso. La señalización conjunta de Shh y el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) induce el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral (Riddle y Pollock, 2003; Smidt et al., 2003).

En la especificación del mesencéfalo intervienen diversos factores de transcripción y crecimiento, los principales se muestran en la figura 2.



Figura 2. Principales factores de crecimiento y transcripción involucrados en el desarrollo temprano del mesencéfalo (Información tomada de Smidt et al., 2003).

El estudio del desarrollo y fisiología de las neuronas dopaminérgicas es de especial interés debido a que la degeneración de ellas es causante de patologías. Tal es el caso de la enfermedad de Parkinson, la cual se caracteriza por una muerte selectiva de las neuronas del grupo A9. Comprender los eventos relacionados a su maduración así como su fisiología pudiera ayudar a entender mejor los factores involucrados dicha enfermedad.

1.2 Factores que intervienen en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se originan en el límite del cerebro medio y cerebro posterior en una zona conocida como MHB (midhindbrain boundary) por sus iniciales en inglés, bajo la influencia de dos importantes centros de señalización: la placa del piso y el itsmo. Los factores secretados por estos centros de señalización son sonic hedgehog (Shh) y FGF8 respectivamente (Lin y Rosenthal, 2003), Shh determina la localización de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en el eje dorso-ventral e induce la expresión del factor de transcripción FoxA2 en el mesencéfalo ventral, quien induce la expresión en mesencéfalo ventral de Shh; mientras que FGF8 regula la proliferación de precursores neuronales y posiciona a las neuronas dopaminérgicas en el eje antero-posterior del tubo neural. (Lin y Rosenthal, 2003; Riddle and Pollock, 2003; Chung et al., 2009; Nakatani et al., 2010).

FoxA2 participa en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas mediante la inhibición de un destino neuronal alternativo, induce la neurogénesis a través del gen proneural Ngn2 y regula al factor de transcripción Nurr1 y a los genes de fenotipo dopaminérgico además de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. FoxA2 es el principal mediador de la señalización de Shh en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas (Chung et al., 2009).

Los factores de transcripción homeobox OTX1, OTX2 y GBX2 están involucrados en la restricción del destino de neuronal dopaminérgico. OTX1 y 2 definen el dominio caudal del mesencéfalo, OTX2 juega un importante papel en la especificación temprana del mesencéfalo ventral y en la regulación de la expresión de FGF8 y Shh; mientras que GBX2 forma el límite rostral del metencéfalo, la interacción entre estos factores de transcripción es la responsable de la localización del centro organizador del istmo. (Riddle and Pollock, 2003).

Una vez que el destino de las NDA es inducido por las señales extrínsecas del MHB, varios genes reguladores son necesarios para iniciar y mantener la expresión de genes dopaminérgicos específicos, así como para la supervivencia de estas neuronas (Lin y Rosenthal, 2003). Las señales extrínsecas inician una cascada que tiene como destino final la formación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Chung et al., 2009), numerosos factores de transcripción han sido involucrados en esta cadena de señalizaciones como lo son Nurr1, Lmx1b, Pitx3, En1 y 2, FoxA 1 y 2, Wnt1,3 y 5 (Lin y Rosenthal, 2003; Smidt et al., 2003; Riddle y Pollock, 2003; Jankovic et al., 2005; Chung et al., 2009; Nakatani et al., 2010). Cada uno de ellos contribuye de manera diferente al desarrollo y maduración de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas positivas a tirosina hidroxilasa (TH) como se observa en la Figura 3. Pitx3, Nurr1, Lmx1b y Engrailed 1 y 2 son especialmente cruciales en la maduración de las NDAs, por lo que se describirán más a detalle.

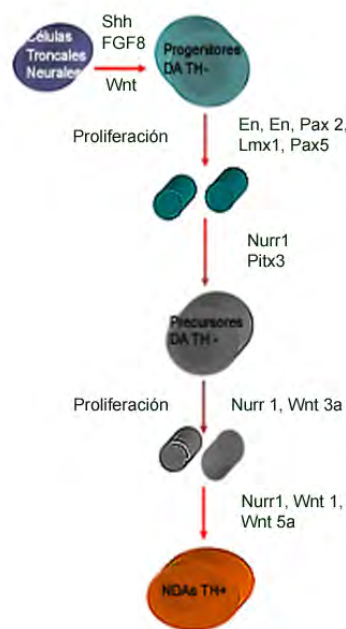


Figura 3. Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas a partir de células troncales neurales. Diversos factores interactúan en la formación de progenitores dopaminérgicos negativos a TH a NDAs positivas a TH (modificado de Jankovic et al., 2005).

➤ *Pitx3*

Pitx3 (paired-like homeodomain transcription factor 3) por sus siglas en inglés, pertenece a una subfamilia de genes homeobox de la pituitaria, se expresa en el lente del ojo, en el músculo esquelético y en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. En lo que respecta a su papel en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, Pitx3 contribuye a la especificación y supervivencia de progenitores neurales dopaminérgicos de la Sustantia Nigra (Nunes et al., 2003; Smidt et al., 2004; Li et al., 2009), los progenitores arriban a la sustantia nigra en desarrollo y requieren de señales de supervivencia, las cuales son provistas por el microambiente de la Sustantia Nigra en forma de factores de crecimiento o por interacciones célula-célula. Pitx3 es requerido en esta etapa de señalización, posiblemente mediante la inducción de receptores para dichas señales (Smidt et al., 2004). Además de ello también contribuye a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas ya una vez diferenciadas (Nunes et al., 2003; Smidt et al., 2004; Li et al., 2009). En el área tegmental ventral Pitx3 y TH son expresadas al mismo tiempo y en ausencia de Pitx3, TH se sigue expresando. Sin embargo, en la Sustantia Nigra la expresión de Pitx3 se da antes de que se exprese TH y en ausencia de Pitx3 los precursores dopaminérgicos no son capaces de expresar TH, lo que sugiere que Pitx3 no interviene únicamente en el desarrollo dopaminérgico mesencefálico sino que juega además un importante papel en la función de estas neuronas en etapas posteriores al desarrollo (Li et al., 2009). Pitx3 también interviene en la regulación de la expresión del gen que codifica la enzima TH (Nunes et al., 2003, Smidt et al., 2004; Li et al., 2010). Pitx3 tiene una expresión tardía en la maduración neuronal dopaminérgica y su expresión es un prerrequisito para la expresión de TH. Además de que la expresión de Pitx3 tiene otras funciones como mantener la expresión de TH en etapas adultas (Li et al., 2009) y regular factores neurotróficos como GDNF Y BDNF, estos factores tróficos juegan un importante papel en el mantenimiento y protección de las neuronas dopaminérgicas. La sobre expresión de Pitx3 puede sobre regular los niveles de proteína y de RNAm de BDNF y GDNF (Li et al., 2009).

➤ *Nurr1*

Nurr1 es miembro de la superfamilia de receptores nucleares, es expresado predominantemente en el Sistema Nervioso Central, específicamente en la SN, en el área tegmental ventral y zonas límbicas. Sin embargo, también se expresa en otras zonas como el bulbo olfatorio, la corteza temporal, el hipocampo, subiculum, cerebelo y el núcleo habenuclear. Nurr1 es de distribución nuclear y se expresa principalmente es neuronas dopaminérgicas, expresándose en una proporción de 96% de las neuronas de la Sustantia Nigra y en 95% de las células en el área tegmental ventral. El nivel de expresión de Nurr1 es diferente en cada etapa, en el desarrollo alcanza su máximo nivel de expresión; sin embargo, en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo permanece en altas concentraciones durante toda la vida del organismo, por lo que no únicamente interviene en el desarrollo sino también en la supervivencia en la edad adulta de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Jankovic et al., 2005).

Nurr1 además es capaz de regular la expresión de otros genes como TH, DAT (transportador de dopamina), VMAT-2 (transportador vesicular de monoaminas 2) y AADC (descarboxilasa de aminoácidos aromáticos). Se ha descrito que Nurr1 interviene en mantener a Pitx3 en etapas tardías del desarrollo dopaminérgico en neuronas mesencefálicas, así como de participar en la regulación de factores tróficos como GDNF, BDNF y FGF actuando probablemente como un regulador transcripcional (Riddle y Pollock, 2003; Smidt et al., 2003; Jankovic et al., 2005; Li et al., 2009; Chung et al., 2009).

➤ *Lmx1b*

Lmx1b es miembro de la familia de homeodominio LIM, se expresa inicialmente en la MHB, en la región dorsal del tubo neural y posteriormente en el desarrollo y etapa adulta de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La expresión temprana de Lmx1 es independiente de Nurr1 y es inducida por FGF8, a su vez Lmx1 no se requiere para la expresión de TH pero si para la de Pitx3 que como se ya se ha mencionado es esencial para el desarrollo dopaminérgico. Lmx1b actúa corriente arriba como activador de Nurr1, TH y Pitx3, y se piensa puede estar involucrado en preparar a la región para la diferenciación del sistema dopaminérgico mesencefálico. Además es esencial para la correcta especificación de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Lin y Rosenthal, 2003; Nunes et al., 2003; Smidt et al., 2003; Li et al., 2009).

➤ *Engrailed 1 y 2*

Los genes En1 y 2 intervienen en el desarrollo del cerebro, ambos se expresan en la región del mesencéfalo y metencéfalo previo a la formación del centro organizador del istmo. En1 se expresa en todos los precursores dopaminérgicos al tiempo en que la primera somita se forma cerca del neuroepitelio anterior mientras que En2 se expresa en algunos precursores dopaminérgicos al tiempo en que la 5a somita se forma. Ambos genes tienen efectos tróficos y han sido involucrados en la regulación del gen y la proteína de la α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas (Lin y Rosenthal, 2003; Riddle y Pollock, 2003; Smidt et al., 2003).

1.3 Desarrollo axonal dopaminérgico mesencefálico

Las neuronas dopaminérgicas proyectan sus axones en dirección rostral formando el haz cerebro medio-cerebro anterior (MHB por sus siglas en inglés) y alcanzan sus estructuras diana en el cerebro anterior, éstas son el cuerpo estriado, el núcleo acumbens o la corteza prefrontal como se puede observar en la Figura 4.

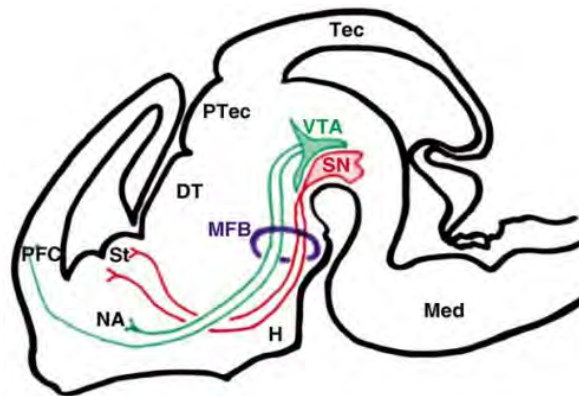


Figura 4. Diagrama de las proyecciones neuronales dopaminérgicas mesencefálicas en el embrión de ratón (día embrionario 13). La región rostral se encuentra a la izquierda y la caudal a la derecha. DT: tálamo dorsal, H: hipotálamo, Med: medula, MFH: medial fore brain, NA: núcleo acumbens, PFC: corteza prefrontal, PTect: pretectum, Tec: tectum, SN: sustantia nigra, VTA: área tegmental ventral. (Lin y Rosenthal, 2003)

Se necesitan de señales para guiar adecuadamente el crecimiento axonal, la ausencia de moléculas repulsivas en el cerebro posterior sugiere la presencia de una señalización de atracción por parte del cerebro anterior. Pax6 y EphB1 y 2 se han identificado como parte de las señales que permiten una correcta inervación dopaminérgica al cerebro anterior. Señales repulsivas también se han involucrado en este proceso tal es el caso de Slit que contribuye a mantener la trayectoria axonal dopaminérgica en la región ventral del cerebro anterior. Posteriormente, los axones dopaminérgicos inervan sus estructuras diana en el cerebro anterior, los axones de las neuronas de la Sustantia nigra proyectan hacia el estriado dorsal mientras que los del área tegmental ventral se dirigen al núcleo acumbens y la corteza prefrontal (Lin y Rosenthal, 2003).

La diferenciación a neuronas dopaminérgicas requiere de la interacción de diversos genes, factores de transcripción y factores tróficos que deben de expresarse en el momento adecuado para llevar a cabo la maduración neuronal adecuada. En resumen los principales eventos que ocurren en la especificación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas son los siguientes:

- Los precursores dopaminérgicos son definidos por la interacción de las señales de Shh y FGF8
- Los genes En1, En2, Wnt1, Pax2, Pax5 y Lmx1b son necesarios para activar el programa de diferenciación en los progenitores dopaminérgicos en el mesencéfalo
- Nurr1 se expresa antes de la diferenciación fenotípica
- Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se originan como tal y expresan TH debido a la interacción de Nurr1 y Pitx3
- Finalmente estas neuronas adquieren los últimos elementos en su maduración, tal es el caso de la enzima TH y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), que son requeridos para la neurotransmisión de la dopamina y establecer una conectividad apropiada con las estructuras aferentes y eferentes (Smidt et al., 2003).

1.4 Sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico posee diversas funciones como lo son la regulación del movimiento, interviene en el aprendizaje, en mecanismos de recompensa y el estrés (Smidt et al., 2003; Jankovic et al., 2005).

1.4.1 Vías dopaminérgicas

En el sistema nervioso central existen tres vías dopaminérgicas, una de ellas es la mesolímbica que está formada por neuronas que se originan en el área tegmental ventral e inervan la amígdala, el núcleo septal o acumbens y el giro cingulata; se encarga de modular la percepción, la cognición y la emoción. Otra de las vías que forma parte de este sistema es la mesocortical la cual une el área tegmental ventral con la corteza cerebral y el lóbulo temporal. Por último la vía nigroestriatal que por su función de regular la conducta motora y por el número de neuronas dopaminérgicas que la forman (más de un 90% de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas) es considerada la más importante; ésta se origina en la Sustantia Nigra e inerva el cuerpo estriado que se encuentra constituido por dos estructuras el caudado y el putamen en primates (Smidt et al., 2004; Jankovic et al., 2005). Es en el estriado donde las NDAs de la Sustantia Nigra liberan el neurotransmisor dopamina el cual participa en el circuito neuronal encargado de la regulación de los movimientos.

1.4.2 Distintas poblaciones en el cerebro

De acuerdo a una descripción en orden rostro-caudal las distintas poblaciones de neuronas dopaminérgicas son las siguientes:

- En neuronas del bulbo olfatorio
- En el hipotálamo organizadas en varios grupos de neuronas: A11, A12, A13, A14 y A15. El A12 es el mayor de estos grupos y comprende las proyecciones tuberoinfundibular y tuberohipofisial, que intervienen en la regulación neuroendocrina.
- En el mesencéfalo organizadas en los grupos A8, A9 y A10. Estos grupos de neuronas se denominan en conjunto neuronas mesencefálicas. El grupo celular A9 está localizado en la Sustantia Nigra pars compacta (SNc) y emite proyecciones hacia el núcleo estriado de los ganglios basales formando la vía nigro-estriatal encargada de regular los movimientos. Los grupos celulares A10 ubicado en el área tegmental ventral y A8 en la zona tubero infundibular. Estos grupos neuronales proyectan aferencias dopaminérgicas las regiones límbicas y de la corteza formando el sistema mesolimbocortical (Smidt et al., 2003; Lin y Rosenthal, 2003).

El estriado es el núcleo más grande de los ganglios basales, constituido por una masa celular homogénea de neuronas espinosas medianas y de interneuronas, está conformado por la matriz y compartimientos denominados parches. La aferencia dopaminérgica de los parches proviene de la región ventral de la Sustantia Nigra pars compacta mientras que la matriz se encuentra inervada por las neuronas del área tegmental ventral, del área rubral y de la lámina dorsal de la Sustantia

Nigra pars compacta (Joel y Weiner, 2000; Antonopoulos et al., 2002; revisado en Purves et al, 2007).

2. Ganglios Basales

2.1 Fisiología de los ganglios basales

Los ganglios basales constituyen uno de los principales circuitos neuronales, ya que es a través de ellos que la corteza cerebral influye sobre la conducta. La información sensorial y sensitiva que reciben es procesada previamente por la corteza cerebral y núcleos intralaminares del tálamo. Las eferencias de los ganglios basales no son directas sobre la medula espinal, sino que forman varios circuitos donde la información fluye desde la corteza hacia el estriado y luego hasta los núcleos más caudales del tronco del encéfalo, posteriormente la información retorna a la corteza a través del tálamo (Abdala, 1998).

Se sabe que los axones colaterales de las vías corticotálamicas, corticocorticales y corticoespinales forman sinapsis glutamatérgicas excitadoras sobre las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado Figura 5.

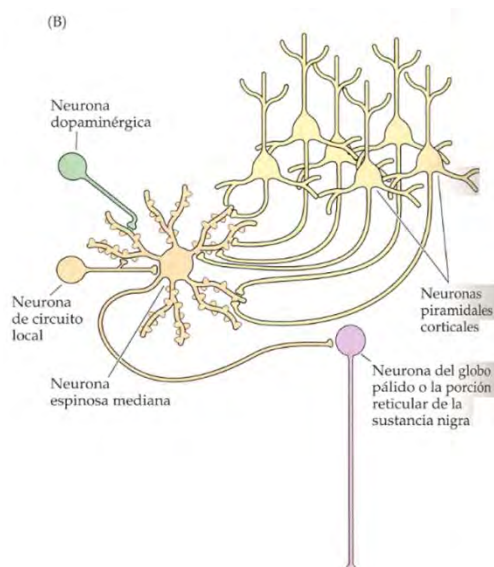


Figura 5. Diagrama de las aferencias convergentes en una neurona espinosa mediana desde neuronas corticales, células dopaminérgicas de la sustancia nigra y neuronas de circuito local. La eferencia primaria de de las neuronas espinosas medianas se localiza hacia el globo pálido y la porción reticular de la Sustancia Nigra (revisado en Purves et al., 2007).

Las sinapsis de las neuronas de circuito local y talámicas se hacen sobre las dendritas y próximas al soma celular. Las aferencias dopaminérgicas se originan en una subdivisión de la sustancia nigra denominada porción compacta debido a sus células densamente empaquetadas, las sinapsis dopaminérgicas se localizan sobre la base de la espina, en estrecha proximidad con las sinapsis corticales donde modulan en forma más directa las aferencias corticales (revisado en Purves et al., 2007) Figura 5.

Los ganglios basales proyectan hacia otras regiones encefálicas, las neuronas espinosas medianas del núcleo caudado y putamen dan origen a proyecciones GABAérgicas inhibitoras que terminan en otro par de núcleos en el complejo de los ganglios basales: la división interna del globo pálido interno y una región específica de la Sustantia Nigra denominada porción reticular. Las neuronas eferentes del globo pálido interno y la porción reticular de la Sustantia Nigra en conjunto dan origen a las vías principales que conectan los ganglios basales con las neuronas motoras superiores localizadas en la corteza y en el tronco del encéfalo. La vía hasta la corteza se origina fundamentalmente en el globo pálido interno y alcanza la corteza motora después de un relevo en los núcleos ventral anterior y ventral lateral del tálamo dorsal. Estos núcleos talámicos proyectan directamente hasta las áreas motoras de la corteza y completan así un asa amplia que se origina en numerosas áreas corticales y termina nuevamente en áreas motoras del lóbulo frontal. Por el contrario, los axones desde la porción reticular de la Sustantia Nigra hacen sinapsis sobre neuronas motoras superiores del colículo superior que dirigen los movimientos oculares, sin relevos intermedios en el tálamo (Abdala, 1998; revisado en Purves et al., 2007).

Como las células eferentes del globo pálido y la porción reticular de la Sustantia Nigra son GABAérgicas, la eferencia principal es inhibitoria. Las neuronas de estas dos zonas de eferencias tienen niveles altos de actividad espontánea que tienden a impedir los movimientos no deseados al inhibir de forma tónica las células del colículo superior y el tálamo. Dado que las neuronas espinosas medias del cuerpo estriado también son GABAérgicas e inhibitoras, el efecto neto de las aferencias excitadoras que alcanzan el cuerpo estriado desde la corteza es inhibir las células inhibitoras tónicamente activas del globo pálido y la porción reticular de la Sustantia Nigra. Este fenómeno de desinhibición permite que las neuronas motoras superiores localizadas en la corteza envíen órdenes a las neuronas del circuito local y a las neuronas motoras inferiores que inician los movimientos (Merello, 1999; revisado en Purves et al., 2007).

2.2 Vía directa e indirecta

Las proyecciones desde las neuronas espinosas medianas del núcleo caudado y el putamen hasta el segmento interno del globo pálido y la porción reticular de la Sustantia Nigra forman parte de una vía directa y tiene como función liberar a las neuronas motoras superiores de la inhibición tónica. Una segunda vía sirve para aumentar el nivel de inhibición tónica y se le denomina vía indirecta, ésta proporciona un segundo camino que conecta el cuerpo estriado con el globo pálido interno y la porción reticular de la Sustantia Nigra. En la vía indirecta una población de neuronas espinosas medianas proyecta hasta el segmento externo o lateral del globo pálido externo, el cual envía proyecciones al segmento interno del globo pálido y al núcleo subtalámico ventral. Sin embargo en lugar de proyectar hasta estructuras fuera de los ganglios basales, el núcleo subtalámico proyecta nuevamente hasta el segmento interno del globo pálido y la porción reticular de la Sustantia Nigra. Estos dos núcleos a su vez proyectan fuera de los ganglios basales, lo que permite que la vía indirecta influya en la actividad de las neuronas motoras superiores. La vía indirecta a través de los ganglios basales sirve para modular las acciones desinhibidoras de la vía directa (Abdala, 1998; revisado en Purves et al., 2007).

Las neuronas del núcleo subtalámico que proyectan hasta el globo pálido interno y la porción reticular de la Sustantia Nigra son excitadoras. Cuando la vía indirecta es activada por señales desde la corteza, las neuronas espinosas medianas descargan e inhiben las neuronas GABAérgicas tónicamente activas del globo pálido externo. En consecuencia, las células subtalámicas se tornan más activas y, debido a las sinapsis excitadoras con células del globo pálido interno y la porción reticular, aumentan la eferencia inhibitoria de los ganglios basales. Al contrario de la vía directa, que cuando se activa reduce la inhibición tónica, el efecto neto de la actividad de la vía indirecta es aumentar las influencias inhibitorias sobre las neuronas motoras superiores. Es por ello que se puede considerar a la vía indirecta como un freno de la vía directa (Merello, 1999; revisado en Purves et al., 2007) Figura 6.

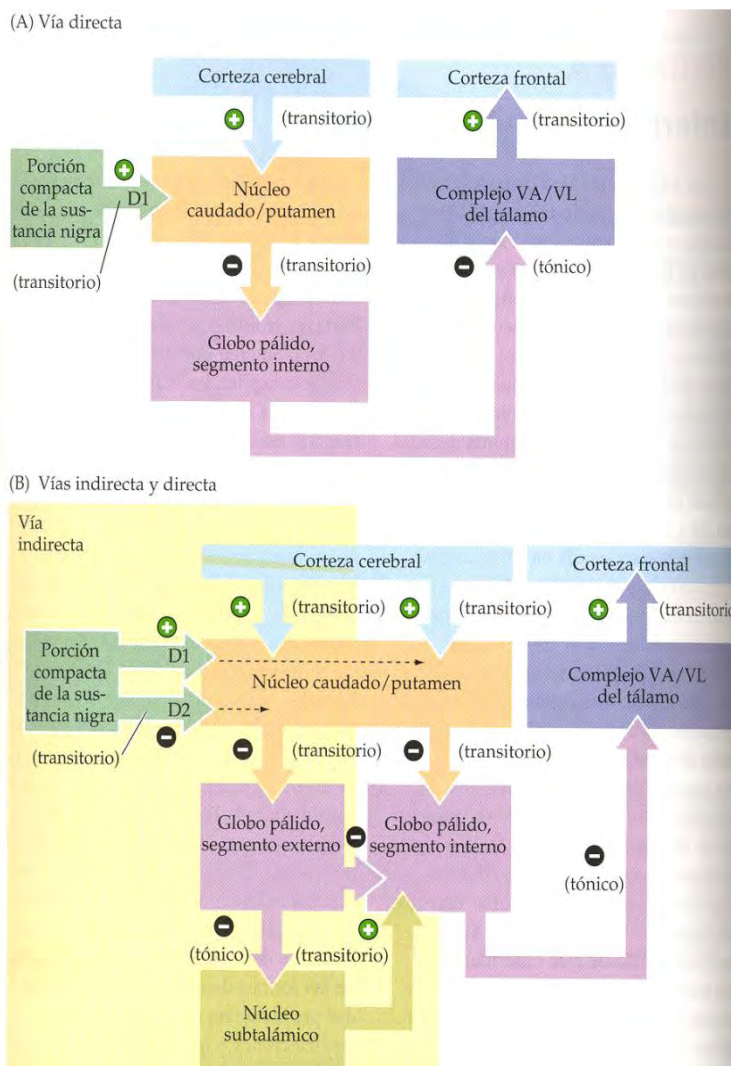


Figura 6. Desinhibición de las vías directa e indirecta a través de los ganglios basales. (A) En la vía directa las proyecciones transitoriamente inhibitorias desde el núcleo caudado y el putamen proyectan hacia neuronas tónicamente inhibitorias activas en el segmento interno del globo pálido que proyectan por su parte al complejo ventral anterior/ventral lateral (VA/VL) del tálamo. Se muestran las aferencias transitoriamente excitadoras hacia el núcleo caudado y el putamen desde la corteza y la Sustantia Nigra, al igual que las aferencias transitoriamente excitadoras desde el tálamo de nuevo hacia la corteza. (B) En la vía indirecta (sombreada), las neuronas inhibitorias de manera transitoria desde el núcleo caudado y el putamen se proyectan hacia neuronas tónicamente inhibitorias activas del segmento externo del globo pálido. La influencia de las aferencias dopaminérgicas nigricas hacia las neuronas en la vía indirecta es inhibitoria. Las neuronas del globo pálido externo se proyectan hacia el núcleo subtalámico que también recibe una aferencia excitadora de la corteza. Por su parte el núcleo subtalámico se proyecta hacia el globo pálido interno donde su impulso transitoriamente excitador se opone a la acción desinhibidora de la vía directa. Así la vía indirecta modula la directa (tomado de revisado en Purves et al., 2007).

La vía directa y la vía indirecta comienzan en el estriado, en la vía directa el estriado inhibe al GPi que a su vez inhibe al tálamo, si se suman dos inhibiciones se tiene como resultado una excitación, por lo que es una vía que favorece el movimiento. La dopamina que la vía directa este activa, entonces en condiciones normales el movimiento esta favorecido por la vía directa. En el estriado los receptores D1 median el funcionamiento de la dopamina en la vía directa. Si la dopamina falta en estriado se produce la EP, la vía directa no se va a favorecer y se presentara hipocinesia (Merello, 1999; revisado en Purves et al., 2007).

En la vía indirecta el estriado inhibe al GPe que a su vez inhibe al núcleo subtalámico que excita al GPi y este inhibe al tálamo. La vía indirecta cuando esta favorecida está en contra del movimiento. Esta vía esta mediada por los receptores del estriado D2, en condiciones normales cuando la dopamina hace efecto en estos receptores la vía indirecta se inhibe, es decir la vía indirecta en condiciones normales no tiende a estar activa. En la EP la falta de dopamina causa que la vía indirecta no esté inhibida sino hiperactiva, esto genera hipocinesia ya que el GPi este constantemente inhibiendo al tálamo (Merello, 1999; revisado en Purves et al., 2007).

Para que la regulación del movimiento sea adecuada ambas vías necesitan de la dopamina, cuando esta falta se producen alteraciones diversas que desencadenan en un desbalance de la regulación. Aunado a ello ambas vías presentan conexiones entre sí por lo que el mecanismo de regulación es mucho más complejo y por ende las consecuencias por la falta de dopamina son de igual forma complejas (Merello, 1999; revisado en Purves et al., 2007).

El desbalance en la activación de ambas vías conduciría a alteraciones en la descarga del complejo GPi /SN dando lugar a la aparición de bradicinesia o hipercinesia. La bradicinesia o acinesia caracterizada por una dificultad y/o lentitud al realizar los movimientos voluntarios, resulta de una inhibición GABAérgica aumentada de las neuronas premotoras talámicas, resultado de una excesiva descarga del complejo Globo pálido interno/Sustantia Nigra (GPi /SN). Esto ocurre luego de la degeneración de la vía nigroestriatal por la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la Sustantia Nigra pars compacta (SNc). Por lo que ocurre una consecuente disminución de la dopamina en el estriado y una subsecuente desinhibición de las neuronas GABAérgicas y encefalinérgicas de la vía indirecta con la consecuente hipoactividad del Globo pálido externo (GPe) y una posterior hiperactividad del núcleo subtalámico, siendo esto una característica importante en la enfermedad de Parkinson, un trastorno hipocinético, cuyas alteraciones se puede ver en la Figura 7 (Graybiel, 1996; Merello, 1999).

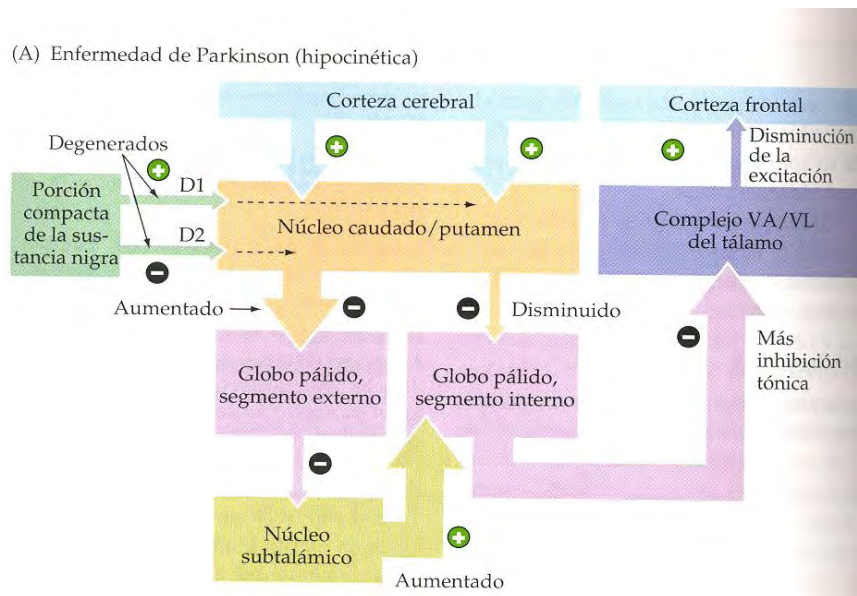


Figura 7. En la EP las eferencias excitadoras proporcionadas por la SN están disminuidas (flechas más finas), lo que torna más complicada la generación de la inhibición transitoria desde el núcleo caudado y el putamen. El resultado de este cambio en la vía directa es sostener la inhibición tónica desde el globo pálido interno hacia el tálamo, lo que torna menos probable la excitación talámica de la corteza motora (flecha fina del complejo VA/VL del tálamo a la corteza frontal) (Tomado de Purves et al., 2007).

3. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la Sustancia Nigra pars compacta y la aparición de agregados aberrantes de la proteína α sinucleína llamados cuerpos de Lewy. En 1817 James Parkinson en su trabajo "Essay on the Shaking Palsy" describió por primera vez esta enfermedad, la cual se caracteriza clínicamente tanto por síntomas motores como no motores. Dentro de los síntomas motores más característicos es la presencia de temblor, bradicinesia, inestabilidad postural, rigidez e hipocinesia (Ortega, 1993; Centonze et al., 1999; Daur y Przedborski, 2003; Bjarkam et al., 2001; Barzilai, 2003; González, 2006; Rodríguez-Gómez et al., 2007; Wang et al., 2007; Rezak, 2007; Olanow, 2009 (b); Olanow, 2009).

El temblor en la EP ocurre en reposo y disminuye en presencia de movimientos voluntarios, la rigidez se refiere a una resistencia al movimiento pasivo de las extremidades, la bradicinesia a la lentitud en los movimientos, la hipocinesia se manifiesta como una reducción en la amplitud de movimientos y por último la acinesia está manifestada por la ausencia total de los movimientos inconscientes (como el movimiento de brazos al caminar) (Daur y Przedborski, 2003). Además de ello, se pueden presentar otros síntomas no motores menos característicos como la hipomimia (escasez de expresión facial), hipofonía (decremento en el volumen de la voz), salivación excesiva, aumento en la velocidad de escritura, zancadas más grandes al caminar, trastornos gastrointestinales, diaforesis (sudoración excesiva), disfagia (dificultad para deglutir) y trastornos psiquiátricos como la depresión (Daur y Przedborski, 2003; Quintero, 2003; McDonald et al., 2003).

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer, Bjarkam y colaboradores en 2001 con base a datos de una población de Escocia reportan que la EP presenta una prevalencia aproximada de 100/100000 con aproximadamente 12/100000 casos nuevos cada año, y esta se incrementa significativamente con la edad. Aproximadamente se presenta en una incidencia de 47/100000 en individuos de 40-49 años, 254/100000 en individuos de 60-69 años y 832/100000 de 70-79 años de edad (Bjarkam et al., 2001). Desde que la población fácilmente supera los 50 años, se hacen mucho más frecuentes las enfermedades neurodegenerativas y por lo tanto cobran una mayor importancia como tema de salud pública. En el caso de México no se han realizado estudios precisos sobre el número de personas con EP, sin embargo se ha estimado sobre la base de los datos obtenidos por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía que existen al menos 500 000 pacientes, situando la prevalencia de la enfermedad en un rango de 50 a 100/100000 habitantes (González, 2006).

3.1 Características neuropatológicas de la EP

Como ya se mencionó, las principales características patológicas de la EP es la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la Sustantia Nigra pars compacta y por ende la alteración de la vía nigroestriatal. Además de la presencia de inclusiones citoplasmáticas proteicas de α sinucleína, ubiquitina y neurofilamentos denominados cuerpos de Lewy, como se observa en la Figura 8.

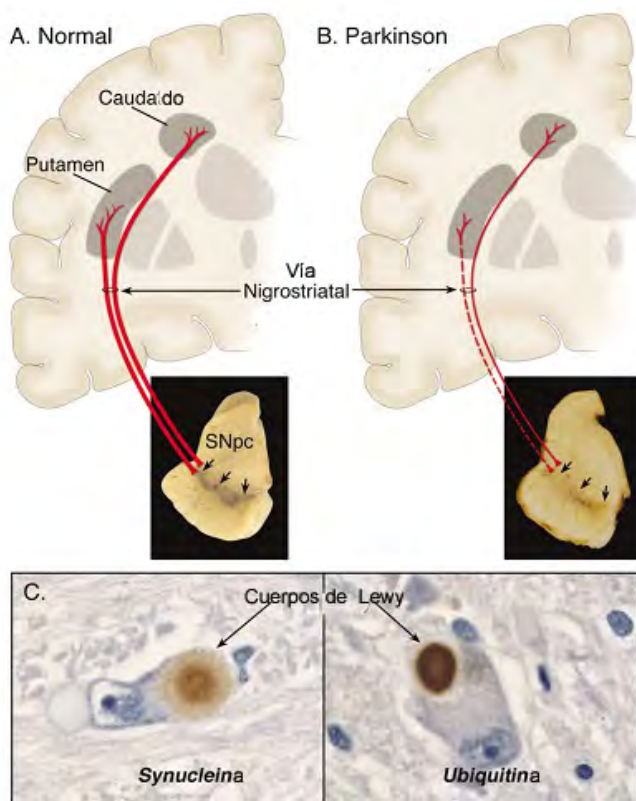


Figura 8. Esquema de la vía nigroestriatal y su degeneración en la EP. En la imagen (A) se ejemplifica en rojo la vía nigroestriatal normal. Los somas de las NDAs están localizados en la sustancia SNc y presentan una pigmentación normal, proyectan tanto al caudado como putamen. En (B) la representación esquemática de la vía nigroestriatal afectada en la EP por la muerte de las NDAs, se observa una disminución notoria en la pigmentación de estas células. La línea roja punteada representa la pérdida casi total de las proyecciones al putamen mientras las que se inervan al caudado se ven afectadas en menor grado. En la imagen (C) se muestra mediante histoquímica la presencia de la α sinucleína y la ubiquitina en los cuerpos de Lewy (modificado de Daur and Przedborski, 2003).

La aparición de los síntomas característicos de la EP se presenta cuando se ha producido una muerte de aproximadamente un 80% de las NDAs, lo que conlleva a degeneración significativa de las terminales dopaminérgicas en el estriado; esta degeneración, está altamente asociada a la pérdida del transportador de dopamina (DAT). Aunado a la muerte de las NDAs del la SNc se degeneran otros grupos neuronales localizados en distintas zonas como en el locus coeruleus, núcleo rafé, núcleo de Meynert, núcleo motor dorsal del vago, corteza cerebral, bulbo olfatorio e hipocampo; la degeneración del hipocampo está asociada a la aparición de demencia en paciente con la EP (Daur y Przedborski, 2003).

El proceso neurodegenerativo de las NDAs, además de estar asociado con la aparición de los cuerpos de Lewy, se asocia con altos niveles de estrés oxidativo y daño mitocondrial en el complejo 1 respiratorio (Bjarkam et al., 2001; Daur y Przedborski, 2003).

3.2 Etiología de la EP

La causa de la degeneración de las NDAs en la SNc causante de la EP no se conoce con exactitud. La muerte selectiva de este tipo celular puede deberse a factores ambientales en el 95% de los casos (Parkinson esporádico), o asociarse a un carácter hereditario (Parkinson genético) en 5% de los casos. Se ha reportado que en ambas situaciones las NDAs sufren un daño en la actividad del complejo 1 mitocondrial (Sherer, 2002; Barzilai, 2003; Quintero, 2003).

Parkinson esporádico

Se han realizado diversos estudios epidemiológicos en varias poblaciones que han presentado un incremento en pacientes con Parkinson, y se han identificado diversos factores ambientales que incrementan el riesgo de padecer la EP (Priyadarshi et al., 2001; Sherer et al., 2002). Los principales factores asociados a la enfermedad son los siguientes:

- Vivir en un entorno rural
- Trabajar en el campo
- Estar expuesto a pesticidas
- Beber agua de pozo regularmente

Parkinson genético

Los principales genes asociados a la EP son siguientes:

α **Sinucleína**, localizado en el locus PARK1 normalmente se expresa en neuronas de ciertas zonas en el cerebro, incluyendo la NDAs de la SNc. El gen que codifica esta proteína está localizado en el cromosoma 4q, y las mutaciones relacionadas con la EP son la A30P y A53T. Su función no se entiende del todo, pero se reconoce su presencia en terminales nerviosas (Daur y Przedborski, 2003; Quintero, 2003).

Parkin, localizado en el locus PARK2 en el cromosoma 6, fue descubierto en familias japonesas con Parkinson autosómico recesivo de aparición temprana. Las mutaciones que se producen son diversas y en individuos jóvenes. No se presentan cuerpos de Lewy en todos los pacientes. Este gen codifica una ubiquitina ligasa E3 que es necesaria para el correcto funcionamiento del proceso de ubiquitinación en la eliminación proteica (Daur y Przedborski, 2003; Quintero, 2003).

Ubiquitina hidrolasa 1 C-terminal. La degradación proteica por la ubiquitina juega un papel importante para mantener la homeostasis celular, la liberación de ubiquitina es catalizada por la Ubiquitina hidrolasa 1 C-terminal localizada en el locus PARK5 y es codificada por un gen localizado en el cromosoma 4p. La mutación I93M se ha asociado con la EP, esta conlleva a una incapacidad en la liberación de ubiquitina resultado de una reducción en la actividad de Ubiquitina hidrolasa 1 C-terminal, lo que resulta en una incompleta o ausente degradación proteica, lo que puede llevar a una acumulación de elementos fibrilares que resultan tóxicos. Esta acumulación de proteínas puede resultar en un daño celular y se asocia a diversas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EP (Daur y Przedborski, 2003; Quintero, 2003).

DJ-1, localizado en el locus PARK7 localizado en el brazo corto del cromosoma 36 en pacientes con EP autosómica recesiva de aparición temprana. La función de la proteína codificada por el gen DJ-1 se desconoce aunque evidencia señala que interviene en la respuesta a estrés oxidativo (Daur y 28Przedborski, 2003; Quintero, 2003).

3.3 Aproximaciones terapéuticas para la EP

Las opciones terapéuticas que se llevan a cabo en la clínica para pacientes con EP se basan en aproximaciones quirúrgicas y farmacológicas. Ambas opciones pueden ser complementarias, ya que se puede dar el caso de que un paciente sea tratado por ambas o bien pacientes que solo son candidatos para una de estas alternativas terapéuticas.

3.3.1 Los tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos son diseñados especialmente para cada paciente dependiendo de su grado de lesión y la respuesta que tenga ante los diversos fármacos. Sin embargo, en general los tratamientos se basan en la administración de un precursor dopaminérgico, la Levodopa, el cual es transformado eficientemente a DA por las NDAs que aún persisten (aproximadamente un 20%), y con ello se logran aminorar las complicaciones motoras de la EP. La dopamina no es utilizada debido a que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica a diferencia de la Levodopa. Sin embargo, al atenderse únicamente los elementos sintomáticos y no la causa de la enfermedad, las NDAs continúan degenerando y el efecto del fármaco se pierde. Aunado a ello, el

tratamiento con levodopa suele traer efectos secundarios motrices como es el caso de discinesias y fluctuaciones motoras, además de efectos secundarios no motrices como náuseas, vómito, hipotensión, diaforesis, síntomas psiquiátricos como alucinaciones y sedación (Kondo, 2002; Rezak, 2007; Olanow, 2008). Las fluctuaciones motoras causadas por la levodopa pueden variar en magnitud, desde aquellas que son consideradas como simples, hasta las que consisten en severas oscilaciones en el funcionamiento motor, en las que el paciente alterna de manera impredecible de un estado con severos síntomas parkinsonianos (“*off*”) a otro con un estado motriz normal (“*on*”), y posteriormente a un estado caracterizado por movimientos involuntarios (discinesias); este fenómeno es conocido como *on-off*. Estos síntomas están relacionados con la dosis y duración de la terapia con levodopa, lo cual es bastante variable debido a la constante degeneración de las NDAs. Al tener la levodopa una vida media de 60 a 90 minutos genera una estimulación excesiva de los receptores dopaminérgicos, alterando su funcionamiento normal y alterando por ende la regulación motriz (Rezak, 2007). Es por todo ello que el tiempo de administración de este tratamiento no sobrepasa periodos de diez años. Para evitar el metabolismo periférico de la DA y con ello la presencia de efectos secundarios relacionados con la activación de receptores dopaminérgicos sistémicos, se administra la Carbidopa, un inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (DOPA descarboxilasa) una enzima importante en la biosíntesis de la serotonina a partir del L-triptófano y en la biosíntesis de la dopamina (DA) a partir de la L-DOPA. En conjunto con la Levodopa y Carbidopa se suele administrar Entacapone, que es un inhibidor de la cateclo-o-aminotransferasa (COMT) que incrementa la absorción de la Levodopa vía intestinal (Rezak, 2007; Olanow, 2008).

Actualmente una gran variedad de fármacos han ayudado a reducir los efectos secundarios de la levodopa y a potencializar su acción. Sin embargo, aún no se llega al desarrollo de un tratamiento farmacológico ideal que alivie todos los síntomas por periodos más prolongados y sin efectos no deseados.

3.3.2 Los tratamientos quirúrgicos

Se han desarrollado diversos procedimientos quirúrgicos que lesionan alguna región componente de los ganglios basales y produce una mejoría en los síntomas motores de la EP. Un tipo de procedimiento realizado es la estimulación eléctrica mediante la implantación de electrodos, este es un procedimiento poco invasivo en el que se implantan electrodos a nivel del tálamo, globo pálido interno o núcleo subtalámico. Sin embargo, las mejorías obtenidas por esta alternativa son temporales y no son específicas, ya que en varias ocasiones se llegan a afectar células adyacentes (Guridi, 2004; Rilling et al., 2005).

A pesar de que el desarrollo de los tratamientos quirúrgicos y farmacológicos ha representado un gran avance en la clínica reduciendo los síntomas motrices de la EP, aún no se desarrolla un método que alivie satisfactoriamente las complicaciones motoras de la enfermedad y que no lleve consigo efectos secundarios. Menos aún se ha desarrollado estrategias que a nivel clínico logre detener el avance de la enfermedad o restablecer la vía nigroestriatal causada por la muerte de las NDAs de la SNc. Es por ello de la necesidad de investigar diferentes aproximaciones que puedan

aportar en alguna medida el desarrollo de mejores alternativas que puedan aplicarse a pacientes con EP. La terapia de reemplazo celular es una de las opciones terapéuticas que se encuentran en fase experimental y ha demostrado resultados satisfactorios.

3.4 Terapia de reemplazo celular

El trasplante de neuronas y/o células gliales provenientes de tejido fetal para restablecer la función de la vía nigroestriatal en pacientes con EP es una posibilidad limitada debido a la restringida cantidad de donadores y a problemas de carácter ético ya que el uso de tejido proveniente de fetos abortados no es aceptado por la sociedad en general; además de inconsistencias en los resultados en pacientes trasplantados con este tipo de tejido. Las células troncales sin embargo, tienen la capacidad de generar tejido neural en cantidades suficientes y es por ello que pudieran ser una alternativa más viable a la de células provenientes de donadores (Goya et al., 2008).

Las células troncales están definidas por dos de sus principales características: la capacidad de autorrenovación y la de diferenciación a varios tipos celulares especializados del organismo adulto (Wang et al., 2007); Figura 9.

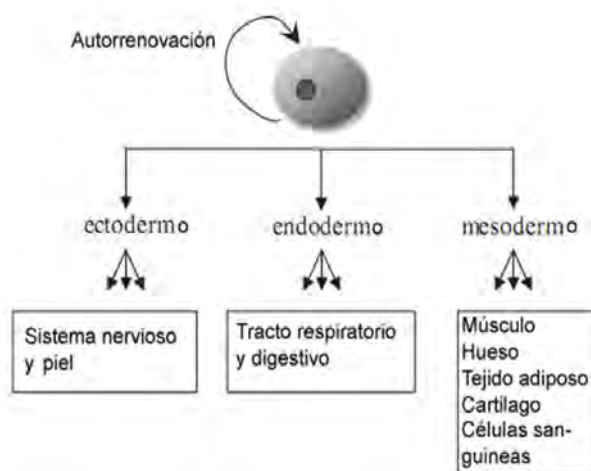


Figura 9. Diagrama esquemático de las principales características de las células troncales. Su capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia los diferentes linajes especializados en el organismo adulto (modificado de Fortier, 2005).

Las células troncales tienen una alta capacidad proliferativa *in vitro*. Su capacidad de autorrenovación está dada por la habilidad de mantener la población de células troncales en un número relativamente estable, a través del mecanismo de división asimétrica mediante el cual cada célula troncal produce al dividirse dos células hijas: una de ellas conserva las características de la célula troncal y la otra célula adquirirá la determinación hacia un linaje en específico. Después se producen células progenitoras, comprometidas a determinados linajes celulares, que

a su vez son las que darán origen a las células diferenciadas. Participan en la regeneración de tejidos en condiciones fisiológicas (homeostasis) o después de una lesión (Perez y Lorenti, 2006).

Las células troncales se clasifican de acuerdo a dos criterios, ya sea por su origen o por su capacidad de diferenciación. Según su origen se clasifican en células troncales embrionarias y adultas, dentro de estas últimas pueden diferenciarse de acuerdo al órgano adulto donde se ubiquen. Las células troncales embrionarias son aquellas que provienen de la masa celular interna del blastocisto, que en el ser humano es el estadio de 4 a 5 días de embriogénesis. Son las más versátiles ya que pueden diferenciarse a todos los tipos celulares de las tres láminas germinales del individuo adulto. Las células troncales adultas se encuentran en los órganos y tejidos del individuo adulto, y son las que darán origen a los diversos tipos celulares especializados del tejido el cual provienen (Wang et al., 2007).

En lo que respecta al potencial de diferenciación, las células troncales pueden clasificarse como totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes, bipotentes y monopotentes. En este orden jerárquico, cada estadio celular produce progenie que, por un lado se renueva así misma, y por el otro, producen células que adquieren un compromiso celular más definido y que al mismo tiempo van perdiendo su capacidad proliferativa. Es así que las células troncales totipotentes tienen un potencial ilimitado, dando origen a todos los tejidos tanto embrionarios como extra embrionarios. Las células troncales embrionarias, las embrionarias germinales, las de carcinoma embrionario y las células pluripotentes inducidas son capaces de dar origen a todas las células de los tejidos de las tres láminas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo (Figura 9). Por el contrario las células troncales adultas varían en su potencialidad, desde multipotentes hasta monopotentes (Gage, 2000; Donovan y Gearhart, 2001; Perez y Lorenti, 2006; Goya et al., 2008; Li et al., 2010).

Se han descrito condiciones que mantienen el estado y pluripotencia de las células troncales, en cultivo se ha observado que las células alimentadoras o *feeders* o bien la adición del factor inhibidor de leucemia (LIF) favorecen que las células troncales conserven su capacidad de potencialidad y de proliferar (Donovan y Gearhart, 2001).

Aún no se comprende totalmente los eventos específicos implicados en la diferenciación celular, sin embargo los conocimientos adquiridos al respecto han servido para desarrollar diversos protocolos de diferenciación celular *in vitro*, que mediante el control de determinados factores de señalización se intenta simular en el mayor grado posible lo ocurrido *in vivo* y de esta manera, obtener una población celular determinada.

La EP se caracteriza por la pérdida selectiva de un único tipo celular, las NDAs de la SNc, es por ello que la terapia de reemplazo celular es una opción viable para esta enfermedad. La perspectiva es que las células troncales embrionarias puedan generar *in vitro* NDAs de la SNc mediante un protocolo de diferenciación específico y pudieran ser trasplantadas en pacientes con EP con la finalidad de sustituir las células degeneradas en la EP.

Se han utilizado comúnmente tres poblaciones distintas de células troncales para la terapia de reemplazo celular en la EP. Las células troncales embrionarias, obtenidas de la masa celular interna de blastocistos en fase de pre-implantación, las células troncales neurales provenientes de cerebro embrionario y adulto, así como las células troncales mesenquimales que pueden encontrarse en la médula ósea y el cordón umbilical (Wang et al., 2007) Figura 10.

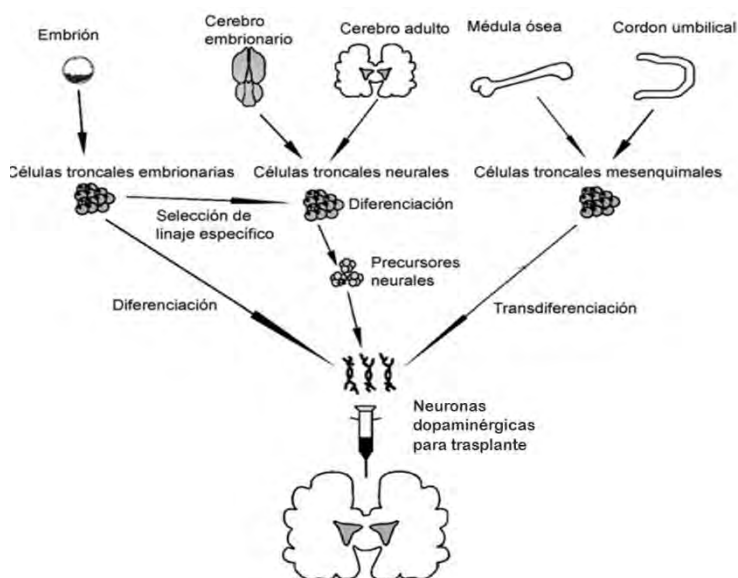


Figura 10. Diagrama esquematizando las fuentes alternativas de células para la terapia de reemplazo celular en la EP (modificado de Wang et al., 2007).

De las distintas fuentes de células troncales para la terapia de reemplazo celular en la EP, las células troncales embrionarias han demostrado ser la mejor opción debido a que no presentan el problema de donadores, tiene una alta capacidad proliferativa en cultivo por tiempos prolongados, además de que tienen mayor capacidad de diferenciación dopaminérgica (Arenas, 2002; Taylor and Minger, 2005; Wang et al., 2007; Arenas, 2010).

3.5 Protocolo de diferenciación de NDAs de la SNc a partir de células troncales embrionarias.

Se ha demostrado ampliamente la capacidad de las células troncales embrionarias de generar NDAs mesencefálicas de la SNc mediante la inducción de la diferenciación, por medio de protocolos específicos para definir este destino celular. Uno de los protocolos más ampliamente usados consiste en un método de 5 pasos. En este protocolo las células troncales embrionarias indiferenciadas son expandidas (etapa 1) y llevadas a la formación de cuerpos embrioides (EBs) (etapa2), estos cuerpos son estructuras que se forman al mantener las células troncales embrionarias en cultivos en flotación después de la etapa de expansión. Posteriormente se seleccionan células positivas a nestina un marcador de precursores neuronales (etapa 3). Esto se realiza mediante la expansión en cultivos en adherencia de las células generadas en la etapa de

cuerpos embrioides. Estas células positivas a Nestina. En la siguiente etapa (etapa 4) se expanden estas células positivas a Nestina mediante moléculas de señalización temprana neural como Sonic hedgehog, el factor de crecimiento de fibroblastos básico y el 8. Finalmente en la última etapa (etapa 5) se lleva a cabo la diferenciación a células positivas a TH, lo cual indica que son neuronas catecolaminérgicas, dentro de las que se encuentran las NDAs de la SNc. Esto se realiza retirando las moléculas señalizadoras administradas en la etapa 4 y agregando ácido ascórbico (Kim et al., 2002; Wang et al., 2007).

La terapia de reemplazo celular es una alternativa que ha demostrado tener diversas ventajas sobre las otras opciones. Es por ello que se han realizado una gran cantidad de estudios con la finalidad de investigar acerca de los procesos implicados en la restitución celular. Para ello se requiere el uso de modelos de la EP que puedan simular las características de la enfermedad.

3.6 Modelos experimentales de la EP

Para poder investigar nuevas opciones terapéuticas como la terapia de reemplazo celular se tienen que hacer uso de modelos experimentales que puedan emular las características en mayor o menor grado de la EP y que sea práctico trabajar con ellos en investigación.

Existen diversos modelos de la EP, desde modificaciones genéticas en moscas hasta primates intoxicados para producir un síndrome muy parecido a la EP, cada uno presenta ventajas y desventajas, éstas se resumen en el Cuadro 1.

CARACTERÍSTICAS DE MODELOS ANIMALES PARA LA EP						
Modelo	Pérdida gradual de las NDAs en la etapa adulta	Déficits motores fácilmente detectables	Desarrollo de cuerpos de Lewy	Basados en una sola mutación	Se desarrolla en un tiempo corto	Modelo animal
6-OHDA	No	Si	No	No	Si	ratas
Rotenona	Si pero varía de acuerdo a la susceptibilidad	Si	Si	No	Si	roedores
MPTP*	No	Si	No	No	Si	primates no humanos, ratones
Drosophila sobreexpresión de α -sinucleína	Si	Si	Si	Si	Si	mosca
Raton sobreexpresión de α -sinucleína	Si pero no en la SN	Si	Si, nuclear y citoplasmático	No, varias	No, 1 año	ratón

Cuadro 1. Se describen las principales características de los modelos animales para la EP. 6-OHDA (6-hidroxi dopamina), MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) Modificado de (modificado de Beal, 2001)

Se deben tomar en cuenta diversas consideraciones para escoger el modelo adecuado, dentro de ellas se toma en cuenta la facilidad de manejo del modelo, el tiempo en el que este se desarrolla, si es medible el grado de lesión, el precio tanto del mantenimiento como del procedimiento para generarlo. A pesar de que cada modelo tiene características distintas que permiten realizar estudios diferentes hay modelos que son más ampliamente usados que otros debido a las características ya mencionadas.

Uno de los más utilizados en diversos laboratorios alrededor del mundo es el uso de la neurotoxina 6-OHDA en ratas.

3.7 Modelo 6-OHDA

La 6-OHDA es un análogo estructural de las catecolaminas dopamina y noradrenalina, ejerce su acción en neuronas catecolaminérgicas. Este modelo fue descrito por primera vez en 1968 por Ungerstedt . El mecanismo de acción es tanto periférico como central, sin embargo es incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica y es por ello que debe administrarse directamente al cerebro mediante cirugía estereotáxica. Una vez administrada la toxina es capturada mediante el transportador de dopamina (DAT) y de noradrenalina (NAT) debido a su afinidad estructural con las catecolaminas (Blum et al., 2001; Simola et al., 2007).

Se ha propuesto que la 6-OHDA genera estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, este efecto es aumentado por elementos intracelulares como el hierro y el manganeso. La toxina ejerce su efecto en la célula causando la muerte por medio de la enzima mono-amino-oxidasa (MAO) que produce peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cuál es un potente agente oxidante. Más aún la toxina sufre un proceso de autooxidación generando de igual manera H_2O_2 , ROS y quinonas, que atacan a los grupos nucleofílicos intracelulares, es decir son afines a cargas positivas, es decir tienen zonas ricas en electrones, ya sea que tengan carga neta negativa (anión), tengan electrones sin compartir o tengan electrones accesibles. Esto genera una rápida disminución de enzimas antioxidantes al interior de la célula, causando alteraciones estructurales y metabólicas en la célula, resultando en un severo daño neuronal que a menudo causa su muerte. Además, se ha observado se produce alteración en el complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial (Beal, 2001; Blum et al., 2001; Daur W. y Przedborski, 2003; Simola et al., 2007; Olanow, 2009).

Al inocular la neurotoxina en un lugar específico del cerebro se produce muerte neuronal catecolaminérgica selectiva de la región inyectada generando efectos conductuales y fisiológicos bastante específicos. Lesiones en la SNC, estriado y el fascículo medial desarrollan un modelo de rata que presenta alteraciones motoras, debido a la degeneración de las NDAs que conforman la vía nigroestriatal tal como se presenta en la patología (Blum et al., 2001; Simola et al., 2007).

Los efectos conductuales observados en un modelo animal en rata se manifiesta como incapacidad para realizar funciones básicas como alimentarse, resultando en una alta mortandad de animales cuando la lesión es manera bilateral, es decir en ambos hemisferios. Sin embargo, cuando es de manera unilateral se producen efectos en los movimientos de las extremidades de los animales como lentitud, imprecisión, falta de movimiento, que asemejan en cierto grado a lo reportado en pacientes con EP. Una ventaja de este modelo es que se puede determinar el grado de lesión por medio de una prueba inducida farmacológicamente. La prueba consiste en administrar sistémicamente un agonista de la dopamina como la apomorfina que actúa sobre receptores dopaminérgicos en el estriado del hemisferio lesionado, estos receptores se encuentran en un estado de hipersensibilización, esta puede darse debido a un incremento en la

afinidad del ligando o un incremento en el número de receptores, esto es debido a la lesión y consecuentemente se produce una conducta de giro contralateral con respecto del lado lesionado. Además se utilizan compuestos como la anfetamina que actúa a nivel de las terminales dopaminérgicas incrementando los niveles de dopamina, produciendo una conducta de giro ipsilateral con respecto al lugar de la lesión. Una ventaja de estas pruebas es que se puede correlacionar la aparición de síntomas motores en los animales con pérdida de NDAs de un 80% aproximadamente, similar a lo observado en pacientes con EP que al presentar degeneración de esta cantidad de neuronas empiezan a manifestar los síntomas asociados con la enfermedad. Sin embargo presenta la desventaja de no generar acumulaciones proteicas como lo que ocurre en la EP con la presencia de los cuerpos de Lewi (Beal, 2001; Blum et al., 2001; Daur W. y Przedborski, 2003; Simola et al., 2007; Olanow, 2009).

El modelo de 6-OHDA fue estandarizado con ratas adultas y por ello la mayoría de los estudios se realizan con este tipo de animales. Aunque los trabajos realizados en animales adultos han servido para vislumbrar una gran cantidad de información en lo que respecta al estudio de la terapia de reemplazo celular, hasta el momento no se ha logrado una comprensión completa de los procesos necesarios para que se logre una regeneración total de la vía nigroestriatal en el modelo animal de la EP con 6-OHDA por medio del trasplante celular. Es por ello de la necesidad de realizar una mayor cantidad de estudios que puedan aportar datos adicionales a los que ya se conocen. Se ha planteado el uso de un modelo de ratas neonatas, este consiste en lesionar ratas en los primeros días postnatales (del 1ro al 7mo en general) con 6-OHDA. La propuesta de este modelo es la de evaluar el efecto que tendría el microambiente de un cerebro joven sobre células trasplantadas en los animales lesionados. Al cambiar drásticamente las características de un cerebro joven con un adulto estos estudios en animales neonatos nos permitirían tener otra aproximación en el estudio de la terapia de reemplazo celular en un modelo de EP con 6-OHDA y con ello extender nuestros conocimientos respecto al tema (Bishop et al., 2004).

3.8 Modelo neonatal de la EP

Se ha reportado que el cerebro a etapas tempranas del desarrollo como lo es en el estadio neonatal es distinto en al cerebro adulto en cuanto al ambiente permisivo para el crecimiento axonal. Un cerebro joven no presenta el nivel de restricción al crecimiento axonal relacionado con elementos de la matriz extracelular y moléculas inhibitorias como se ha reportado en un cerebro maduro. Es por ello que para estudiar el efecto del ambiente permisivo de un cerebro en desarrollo varios autores han trabajado en un modelo neonatal (Joyce et al., 1996; Chapman y Mckinnon, 2000; Butz et al., 2009).

3.8.1 Plasticidad neonatal

La plasticidad en el cerebro se refiere a la capacidad de este para adaptarse ante la presencia de elementos o fenómenos que alteren su funcionamiento basal. Esta plasticidad está referida como cambios tanto estructurales como funcionales que ocurren en el cerebro posterior a una lesión o durante el desarrollo (Chapman and Mckinnon, 2000; Manning, 2008). Diversos factores pueden

alterar el proceso de plasticidad cerebral como lo son el tipo de lesión, el tiempo por el cual se produce el daño, algún proceso patológico que pueda estar presente, la región del cerebro afectada, la extensión del daño y la edad del individuo a la cual recibe la lesión (Chapman and Mckinnon, 2000; Butz et al., 2009).

Se sabe que mientras más joven es el cerebro su capacidad de realizar cambios adaptativos posteriores a una lesión es mayor, el principio de Kennard establece que la tasa de recuperación ante una lesión en el cerebro es mayor en individuos jóvenes que en adultos. Kennard realizó varios tipos de lesiones en cerebros de monos infantes y adultos, evaluó su recuperación mediante pruebas motoras y registros de electroencefalogramas, observando que los monos infantes presentaban mayor y más rápida recuperación que los adultos (Dennis, 2010). No se conoce con exactitud los procesos implicados en la plasticidad del cerebro joven sin embargo se sabe es que al nacer, el cerebro aún no ha concluido su proceso de maduración y cuando la lesión se produce en este periodo postnatal el proceso adaptativo es mucho mayor con respecto a un cerebro adulto debido a que aún se están produciendo cambios asociados a la maduración. El ambiente que favorece los procesos relacionados a la terminación de la maduración del cerebro postnatal, permitirían responder de una mejor manera al cerebro ante un daño determinado, este ambiente propicia una abundante generación de ramas axonales así como la formación de sinapsis en este periodo de desarrollo en contraste con las que se generan en un cerebro en etapa adulta (Joyce et al., 1996; Chapman y Mckinnon, 2000; Butz et al., 2009).

Las distintas regiones del cerebro sin embargo maduran postnatalmente de manera heterogénea en lo que se refiere al periodo de tiempo que les toma completar un estado maduro, de esto depende que unas zonas tengan una mayor capacidad de adaptación que otras (Chapman y Mckinnon, 2000).

3.8.2 Fenómenos implicados en la plasticidad después de una denervación de DA en neonatos

Las consecuencias funcionales de la depleción estriatal de DA en las ratas adultas inyectadas con 6-OHDA han sido estudiadas exhaustivamente (Rodríguez et al., 2001). En contraste estudios similares realizados en animales neonatos son relativamente escasos. La lesión en neonatos no produce los mismos efectos sensitivo-motores observados en los individuos adultos como acinesia o hipocinesia. Se ha reportado que los animales neonatos se ven afectados en menor grado en comparación a lo observado en individuos maduros, ante una lesión del sistema dopaminérgico con 6-OHDA. Esta característica no se presenta únicamente durante el periodo post-lesión de los neonatos, sino que se mantiene ausente a lo largo de la vida del animal, lo cual podría indicar que las características intrínsecas de un cerebro más joven favorecerían un menor daño y/o un proceso de recuperación más eficiente que el de un cerebro adulto (Weihmuller y Bruno, 1989; Shao-pii, 1990; Abrous et al., 1992; Bruce et al., 1992; Fernandes et al., 1994; Joyce et al., 1996).

Se ha encontrado que la lesión neonatal no presenta síntomas motores similares a la lesión en adultos, sin embargo si se han registrado síntomas no motrices en neonatos como la presencia de problemas en el aprendizaje, indicando que aunque el sistema dopaminérgico se encuentra inmaduro, juega un papel importante en etapas tempranas de desarrollo. En general en estos

trabajos se afirma que pudiera haber una ventana en las primeras semanas de desarrollo (hasta la tercera) en el que el cerebro tendría un alto grado de plasticidad, alcanzando el sistema dopaminérgico su período de madurez a los 35 días (Weihmuller y Bruno, 1989; Abrous et al., 1992). Se plantean, como explicación de este fenómeno de plasticidad en el cerebro neonato, los siguientes procesos:

- Se producen cambios compensatorios en sistemas no dopaminérgicos y asumen las funciones que normalmente realizaría el sistema dopaminérgico.
- Adaptaciones en las terminales dopaminérgicas
- Cambios en la respuesta postsináptica ante una menor cantidad de dopamina

Estudios con antagonistas de los receptores dopaminérgicos en neonatos lesionados con 6-OHDA han demostrado que la susceptibilidad de la neurotoxina es similar en adultos y neonatos, lo cual indicaría que una menor cantidad de síntomas motores en el neonato no se debe a una menor afectación por la toxina, por el contrario se pudiera atribuir a un efecto de plasticidad donde pudieran verse involucrados procesos compensatorios (Weihmuller y Bruno, 1989; Avale et al., 2004).

El cerebro adulto lleva a cabo cambios adaptativos tras sufrir una lesión del sistema dopaminérgico. Sin embargo, este tipo de cambios son llevados a cabo de forma más eficiente en un cerebro joven. Uno de los cambios reportados en cerebros neonatos tras sufrir la depleción de la vía nigroestriatal es que la recaptura de dopamina extracelular se incrementa en un 30% del nivel basal aunque la depleción del sistema dopaminérgico nigroestriatal haya sido superior al 99%, indicando un incremento sustancial en la eficiencia de la recaptura de la dopamina residual (Abrous et al., 1992). Probablemente esta recaptura de DA se encuentre relacionada con una menor manifestación motora de la lesión con 6-OHDA en animales neonatos con respecto a animales adultos.

Observaciones histoquímicas han revelado la presencia de una reorganización anatómica de tipo heterotípica, se ha documentado la presencia de un incremento en terminales serotoninérgicas intraestriatales posterior a una lesión dopaminérgica en un cerebro neonato, fenómeno que no se presenta en un cerebro adulto tras la misma lesión (Shao-pii, 1990; Abrous et al., 1992; Fernandes et al., 1994; Avale et al., 2004).

3.8.3 Fenómenos compensatorios posteriores a la lesión con 6-OHDA en neonatos

La pérdida de DA en ratas en períodos postnatales, causada por la lesión con la neurotoxina 6-OHDA resulta en un incremento compensatorio de los niveles de serotonina (5HT), consecuencia de una hiper inervación de fibras serotoninérgicas en el neo-estriado dorsal y rostral. Esta inervación es de tipo heterotípica al involucrar fibras de un neurotransmisor distinto a la DA. El término de hiper inervación se refiere a una inervación mayor a la que se presenta de forma fisiológica en una región específica, por un tipo de terminal axónica determinada (Radja et al., 1993; Avale et al., 2004; Cunningham et al., 2005).

Conductualmente se ha reportado que las ratas neonatas, tras ser lesionadas, presentan una conducta de hiperactividad o aumento de la actividad espontánea, en contraste a lo observado en animales adultos lesionados que presentan una disminución o ausencia en la actividad (hipocinesia o acinesia). La hiperactividad está relacionada con la sensibilización post sináptica de los receptores D_1 , además del cambio en sistemas no dopaminérgicos como el aumento de la inervación serotoninérgica con el incremento de sus respectivos receptores 5-HT (Concannon y Schechter, 1979; Bruce et al., 1992; Luthman, 1993). Los axones serotoninérgicos que conforman esta hiper inervación tienen su origen en el núcleo de Rafé, que normalmente proyecta sus eferencias hacia al estriado caudal, pero en respuesta a la lesión inervan la región dorsal. Como consecuencia, el nivel de serotonina en la región dorsal del estriado se puede llegar a triplicar (Descarries et al., 1992; Radja et al., 1993; Avale et al., 2004; Bishop et al., 2004; Bishop et al., 2004; Fernandes et al., 1994). Se ha reportado que se produce incremento en los niveles del receptor de dopamina D_2 mientras que el receptor D_1 no presenta cambios en este proceso. Diversos estudios señalan que los receptores 5-HT_{2A} son los que median el incremento de serotonina en el neo-estriado depletado de DA. La sobre estimulación de este receptor media la conducta de hiperactividad característica de roedores depletados de DA en periodos postnatales (Radja et al., 1993; Bishop et al., 2004). Se ha demostrado que al administrar en el estriado dorsal DOI [(+/-)-1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane], un agonista de estos receptores, en ratas depletadas de DA en periodos neonatales, se incrementa la actividad espontánea o hiperactividad, medida como movimientos estereotípicos, distancia total recorrida en un tiempo determinado y episodios de movimientos, parámetros que miden la actividad motriz y cuyo incremento refleja una conducta anormal (Bishop et al., 2004), lo que demuestra que los receptores 5-HT_{2A} se encuentran implicados en la conducta hiperactiva. Además, se ha asociado un incremento en el receptor 5-HT_{1B} en regiones como el neostriado, globo pálido y sustantia nigra, siendo esta última estructura la de mayor aumento. El receptor 5-HT₁ también ha demostrado un incremento sustancial en la sustantia nigra seguido del plexo coroideo y el neostriado. Este incremento de receptores se mantiene en los animales adultos después de ser lesionados en etapa neonatal (Radja et al., 1993).

Toda esta evidencia demuestra que se llevan a cabo mecanismos compensatorios al presentarse una reorganización a nivel estructural (hiper inervación) y funcional (liberación de neurotransmisores) tras la disminución drástica de la DA en un cerebro durante el periodo neonatal, producto de la lesión con 6-OHDA (Radja et al., 1993). Sin embargo, se conoce poco sobre el total de cambios que se producen en el cerebro, posterior a la lesión postnatal con 6-OHDA, y cómo se logra aminorar y/o evitar los efectos vistos en animales adultos lesionados. El estudio y entendimiento más profundo de este proceso podría implicar conocer las condiciones necesarias para la regeneración tras un daño del sistema dopaminérgico en individuos con patologías en donde se ven afectadas las NDAs como es el caso de la EP.

Con la finalidad de estudiar el microambiente permisivo para la recuperación del sistema dopaminérgico nigroestriatal en individuos a etapas tempranas de desarrollo se ha planteado como modelo el uso de roedores neonatos, en particular ratas, lesionados con la neurotoxina 6-

OHDA mediante una cirugía estereotáxica como modelo para investigar la EP (Abrous et al., 1993) Por ello, se ha investigado la terapia celular reconstitutiva en este modelo, una de las principales alternativas terapéuticas para la EP.

3.8.4 Terapia de reemplazo celular en un modelo neonatal de la EP

Diversos factores están implicados en la supervivencia e integración de un trasplante en el cerebro, de ellos dependerá que un trasplante pueda ser útil en la recuperación tras la pérdida de una función por una lesión, el sitio de trasplante, la disponibilidad de factores tróficos, el tipo de lesión, el tipo de tejido o tipo celular trasplantado son solo algunos de ellos. La edad del donador (en caso de tratarse de un trasplante proveniente de un cultivo primario) y/o del receptor han demostrado ser elementos fundamentales en la viabilidad y funcionalidad del trasplante (Sable et al., 1997).

Se han realizado estudios comparando trasplantes de células dopaminérgicas provenientes de tejido mesencefálico en desarrollo en animales lesionados tanto adultos como neonatos. En estos trabajos se ha reportado una mejor integración del trasplante en los neonatos, determinada por parámetros como tamaño del injerto, migración de las células, supervivencia celular, desarrollo de procesos neuríticos por parte de las células trasplantadas y recuperación conductual. En neonatos se ha reportado que las células trasplantadas tienden a dispersarse y a migrar a diversas regiones del cerebro como a lo largo del neo-estriado, el fascículo medial, la sustancia nigra en contraste a lo reportado en individuos adultos en los que se forma un cúmulo compacto de células (Abrous et al., 1993; Abrous et al., 1993(b); Sable et al., 1997). También se reportó la presencia de pequeños cúmulos de células trasplantadas en los neonatos, sin embargo éstos tienden a migrar de igual manera que las células individuales. Además de presentar mayor dispersión las NDAs trasplantadas en los neonatos han demostrado generar mayor cantidad de prolongaciones axónicas. Conductualmente se observa que el trasplante redujo significativamente la hiperactividad asociada a la lesión. Sin embargo estas células no son capaces de mejorar la pérdida de habilidad motriz en las extremidades evaluados con la prueba de “*paw reaching*” (Abrous et al., 1993(b)). Una posible explicación sería que las células del trasplante no inervan todas las zonas afectadas en una pérdida de habilidad motriz en las extremidades a causa de la lesión, aunado a que el trasplante de NDAs mejora la actividad de hiperactividad al liberar dopamina en el neo-estriado donde se encuentran los receptores dopaminérgicos que están en estado de sensibilización, sin embargo las células no están generando una reinervación de la vía nigro-estriatal (Abrous et al., 1993(b))

Hasta ahora todos los estudios de reemplazo celular realizados en neonatos han tomado como fuente celular tejido mesencefálico de fetos, sin embargo como ya se ha mencionado trabajar con este tipo de células presenta diversas desventajas. Es por ello que en nuestro estudio utilizaremos el modelo neonatal en el cual se estudiará el trasplante celular, sin embargo a diferencia de trabajos previos, las células que se trasplantarán serán obtenidas por medio de un protocolo de diferenciación en el que a células troncales embrionarias de rata se les aplicarán diversos factores que promoverán su diferenciación hacia NDAs.

ANTECEDENTES

En 1987 Carder y Snyder-Keller lesionaron ratas neonatas al segundo o tercer día postnatal con 6-OHDA y compararon los efectos conductuales con respecto a lo reportado en ratas adultas, encontrando diferencia entre animales de ambas edades. Los animales adultos presentan deficiencias motoras notorias mientras que en los neonatos las alteraciones son en menor grado. Dos o tres días después de la lesión, las ratas neonatas recibieron un trasplante en el estriado unilateral de una suspensión de células con gran cantidad de NDAs obtenidas del mesencéfalo ventral de embriones a los 14 días de gestación. En el periodo de dos a cuatro meses postnatales observaron que en el lado sin trasplantar no se presentaba inmunorreactividad para TH mientras que en el hemisferio trasplantado si se presentaba en la región del estriado rostral y el septum. En la región del estriado se observaba una gran inervación reactiva a TH. Realizaron pruebas de giro inducidas por anfetamina y no observaron diferencias entre ratas control y trasplantadas. Concluyen que las células trasplantadas son capaces de sobrevivir e inervar el estriado provocando ello una recuperación conductual, en contraste a lo observado en trasplantes con animales adultos, y ellos lo atribuyen al ambiente favorecedor de un cerebro joven.

Herman y colaboradores en 1991 realizaron estudios muy similares, en donde lesionaron ratas adultas y neonatas mediante 6-OHDA. Posterior a la lesión se injertaron en el estriado células precursoras dopaminérgicas mesencefálicas provenientes de embriones de ratas. Herman describe que las células trasplantadas en neonatos presentaban una tendencia a migrar del sitio de inyección, en contraste a lo que observó en adultos, en los que reportó que las células se organizaban en cúmulos ubicados en el sitio de trasplante. En su trabajo reportó que la mayoría de las células trasplantadas en neonatos se localizaron lejos del sitio de trasplante. Las regiones en donde encontró células fueron: en el cuerpo calloso, regiones aledañas al ventrículo lateral, en el ventrículo lateral, hipocampo, septo ventral, así como en la mayoría de las regiones del estriado. Herman discute en su trabajo que la migración de células en neonatos trasplantados, en contraste a adultos trasplantados, pudiera deberse a diversas causas como que el hecho de que en el cerebro neonato los programas de migración se encuentran aún activos, lo que podría contribuir con señales que favorezcan la migración neuronal. Conductualmente realizaron pruebas de giro inducidas por apomorfina y el agonista del receptor D_1 SCH-38393 y observaron que la conducta de giro era atenuada por el trasplante.

Posteriormente en 1997 Sable y colaboradores llevaron a cabo trasplantes intraestriatales de células DA provenientes de mesencéfalo ventral del día 15 de gestación en ratas adultas intactas y lesionadas con 6-OHDA, además de ratas neonatas intactas. Las células del trasplante en las ratas adultas intactas formaron un cúmulo compacto y aislado, indicando poca integración, además de presentar reacción glial mínima. Por otra parte, las células trasplantadas en las ratas adultas lesionadas se dispersaron y hubo mayor reacción glial. En contraste, el trasplante en neonatos fue el que demostró una mayor dispersión celular, mayor cantidad de prolongaciones axonales y una reacción glial mucho menor. Los autores concluyeron que en el cerebro neonato el ambiente es

más permisivo al suponer que hay una disponibilidad de los factores de crecimiento con respecto a un cerebro adulto.

JUSTIFICACIÓN

La EP la padecen en su mayoría personas de edad avanzada que poseen un cerebro maduro que es poco permisivo para el crecimiento axonal. Los trasplantes realizados en un modelo adulto lesionado de la vía nigroestriatal han señalado la poca integración de las células así como una limitada recuperación conductual. Es por todo ello que sería interesante evaluar si el ambiente de un cerebro neonato el cual es permisivo para el crecimiento axonal tendrá algún efecto en la eficacia con que las células TH positivas provenientes de un protocolo de diferenciación tengan sobre una posible recuperación conductual en animales neonatos lesionados de la vía nigroestriatal.

HIPÓTESIS

El ambiente de un cerebro neonato favorecerá que células TH diferenciadas y trasplantadas ayuden a la recuperación conductual de animales lesionados de la vía nigroestriatal, en contraste a lo observado en un trasplantes en cerebro adulto.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características de un trasplante de neuronas inmunorreactivas a TH provenientes de un protocolo de diferenciación de células embrionarias y su repercusión en la conducta de los animales lesionados neonatalmente, con deficiencias similares a las presentadas en la EP.

OBJETIVOS PARTICULARES

Diferenciar células embrionarias de la línea celular R1 a neuronas que presenten inmunorreactividad a TH por medio del protocolo de 5 pasos desarrollado por Lee y colaboradores en el 2000.

Lesionar ratas neonatas de 1 día postnatal con la neurotoxina 6-OHDA y evaluar el grado de lesión por medio de la inmunohistoquímica para TH y una prueba conductual de actividad espontánea en campo abierto.

Transplantar las neuronas dopaminérgicas derivadas del protocolo de diferenciación, en el modelo neonatal de la EP en el tercer día postnatal.

Caracterizar el trasplante por medio de inmunohistoquímicas para TH y M2 (para detectar la presencia de las células de origen de ratón, es decir provenientes del trasplante), evaluar la morfología de las células presentes en el tejido.

Evaluar la conducta espontánea y determinar si el trasplante repercutió en una mejoría de los animales lesionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se adquirieron 5 ratas hembras Wistar a término de gestación y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 hrs cada uno, con acceso de agua y alimento *adlibitum* a una temperatura ambiental controlada de 23 °C. Un total de 5 camadas fueron utilizadas para este estudio (n=57). El trabajo con los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM 002-Z00-1999) en vigencia y de la *guide for Care and use of Laboratoy Animals, National Institutes of Health*.

Modelo de ratas neonatas parkinsonianas

Al primer día postnatal ratas neonatas machos y hembras fueron lesionadas de forma bilateral mediante una inyección intraventricular de 6-OHDA, mientras que a 7 animales se les administró solución salina fisiológica con la finalidad de ser utilizados como controles positivos dentro de la misma camada (datos no mostrados).

Las ratas fueron anestesiadas con sevoflorano (Sevorane Abbot, México) a dosis de inducción (3.5%) y 0.5% de mantenimiento en una mezcla de oxígeno y bióxido de carbono (95%-5% respectivamente). Los animales fueron colocados en un equipo estereotáxico con un adaptador para neonatos (Stoeling, USA). Posterior a la asepsia quirúrgica se realizó una incisión en la parte media del cráneo para localizar bregma. Una vez localizada, se partió de ella como punto de referencia para localizar los ventrículos laterales con las coordenadas estereotáxicas de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson: Antero Posterior (AP) -0.6 mm, Medio Lateral (ML) +/- 0.8 mm y Dorso Ventral (DV) -2.1 mm (Nikkhah et al., 1995).

Se administraron 50µg en 5µl de 6-OHDA disuelto en NaCl al 0.9% y 0.2 mg de ácido ascórbico, utilizando un microinyector automatizado (Stoeling, Quintessential Stereotaxic Inyector, USA). El inyector utilizado es de un diámetro de 30 gauches (30 G), este es desarrollado en el laboratorio con la finalidad de causar un menor daño mecánico.

Después de la lesión las ratas fueron regresadas con su madre para ser cuidados y alimentados por ella. Todas las ratas neonatas fueron mantenidas en la misma caja (el número de animales por caja varió dependiendo del número de crías por camada, de 8 a 16 crías), para evitar hacinamiento se pasaron a cajas grandes.

Evaluación conductual de las ratas lesionadas

Para comprobar la lesión con la neurotoxina 6-OHDA, se realizó una prueba de actividad locomotora espontánea de campo abierto. La evaluación conductual se realizó 20 días después de la lesión al día postnatal 21 (P21). Para ello se utilizó una cámara de actividad cinética (VersaMax Animal Activity Monitoring System, Aucascam Instruments, USA) la cual se basa en un sistema de rayos infrarrojos que registran los movimientos del animal, tanto horizontales como verticales, en una superficie de 43 cm². Durante el estudio se evitó que los animales recibieran luz de manera directa con el propósito de evitar que se viera afectada la actividad espontánea fisiológica de las ratas, dando un periodo de habituación de 5 minutos previo al inicio de la prueba, la cual consistió en una exploración de 30 minutos tomando en cuenta los siguientes parámetros: distancia total recorrida, movimientos estereotípicos, conteos verticales, conteos ambulatorios, tiempo ambulatorio y tiempo en reposo.

Perfusión y cortes histológicos

Al día P22 postnatal los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis anestésica (3 mililitros por 2.5kg) de Pentobarbital Sódico (Pfizer, MEX) y posteriormente las ratas fueron perfundidas con solución salina a 37 °C por vía intracardiaca con la ayuda de una bomba de perfusión (Cole-Parmer Instrument Company, Masterflex, USA). Una vez realizado este procedimiento los animales fueron fijados con paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M a un pH de 7.4. Se deshidrató el cerebro, y se mantuvo en gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%) para posteriormente efectuarse cortes sagitales de 30 µm con la ayuda de un criostato (Leica, USA) (Díaz *et al.* 2007).

Técnica inmunohistoquímica

La incubación de los cortes histológicos de cerebro se realizó de acuerdo a lo descrito por Díaz *et al.* (2007) para los siguientes anticuerpos primarios: anti-Tirosina Hidroxilasa, anti-Tubulina β-III de tipo monoclonal y los núcleos fueron marcados con DAPI para ser evidenciados. Los cortes fueron

incubados por 20 minutos en una solución de PBS con suero de cabra (Gibco, Invitrogen) al 10% y tritón (Sigma-Aldrich) al 0.3%. Posteriormente, se enjuagaron con PBS y se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales anti-tirosina hidroxilasa (Sigma-Aldrich) hecho en ratón a una dilución 1:1000, anti- β Tubulina III (Covance, USA) a una dilución 1:1000 o anti-M2 hecho en ratón (Sigma,USA) a una dilución 1:1000 en una solución de PBS-suero de cabra por 48 horas a temperatura ambiente. Seguido de ello se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados en una solución de PBS con albumina al 0.1% para después ser incubados los cortes con sus respectivos anticuerpos secundarios: anti-ratón (dilución 1:1000 en PBS-suero de cabra al 1%) acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) por 4 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Los cortes fueron lavados con PBS y se incubaron con DAPI (1 ng/ml; Sigma) por 5 minutos, se lavaron nuevamente con PBS y se montaron en laminillas. La técnica de montaje consistió en colocar cuidadosamente los cerebros por laminilla, dejar a secar en oscuridad y posteriormente colocar cubreobjetos con un medio de montaje (Aqua Poly/Mount, Polyscience, Inc) para finalmente sellar la laminilla con barniz.

La lesión del tejido fue analizada de manera cualitativa observando la inmunorreactividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina, para posteriormente corroborar estos datos con la evaluación conductual de los sujetos lesionados, controles y trasplantados.

Protocolo de diferenciación

Las células troncales embrionarias de ratón provienen de la línea celular R1. El protocolo de diferenciación consiste en 5 etapas y fue descrito por Lee y colaboradores en el año 2000.

La primera etapa del protocolo consiste en la expansión de las células troncales. Se sembraron las células en cajas cubiertas con 0.1% de gelatina por un periodo de 7 días aproximadamente. Se utilizó medio KO-ES adicionado con el factor inhibidor de leucemia (LIF) para mantener el estado indiferenciado de las células.

La segunda etapa consiste en la formación de cuerpos embrioides. Para ello se realizó un pasaje de las células en etapa1, éstas fueron sembradas en cajas para cultivo no adherentes, estas cajas no están tratadas con poli-D-lisina que permite que las adherencia de las células en cajas para cultivo adherente. El cultivo en suspensión permite la formación de agregados celulares. Esta etapa dura un aproximado de 7 días y es de igual manera que la primera con medio KO-ES adicionado con LIF.

En la tercera etapa se seleccionan células positivas a nestina. Para ello los cuerpos embrioides son sembrados en cajas de cultivo adherente con medio KO-ES durante un día. Posteriormente el medio es reemplazado por medio ITS adicionado con fibronectina para favorecer la adherencia de las células. Las células fueron mantenidas en estas condiciones por un periodo de 6 a 8 días aproximadamente.

La expansión de estas células positivas a nestina se da en la cuarta etapa del protocolo. El medio ITS es sustituido por medio N2 y las células son sembradas sobre cubre objetos en cajas de cultivo adherente de 24 pozos recubiertas con poli-L-ornitina/fibronectina a una densidad de 5×10^5 células. Al medio se le adicionó bFGF, ácido ascórbico, sonic hedgehog y FGF8. Esto por un periodo de 4 a 6 días.

La última etapa corresponde a la selección de células TH positivas. Para ello se indujo la diferenciación de las células nestina positivas retirando del medio N2 el bFGF, Shh, y FGF8. Las células únicamente fueron sembradas en medio N2 con ácido ascórbico por un periodo menor a 6 días.

Trasplante de NDAs derivadas de células troncales embrionarias

El trasplante se realizó de forma intranigral al día P3, que corresponde al segundo día postlesión. Para el trasplante las ratas fueron anestesiadas y colocadas en un equipo estereotáxico como se describe en el apartado de lesión sevoflorano. Los animales (n=12) fueron trasplantados en las siguientes coordenadas a partir de bregma y referente al atlas de Paxinos & Watson fueron: Antero Posterior (AP) -3.7 mm, Medio Lateral (ML) +1.6 mm y Dorso Ventral (DV) -4.3 mm (Nikkhah et al., 1995).

Técnica estereotáxica

Para la lesión y trasplante de los animales, éstos fueron colocados en un adaptador para neonatos tal y como se observa en la Fig. 1 A y B.

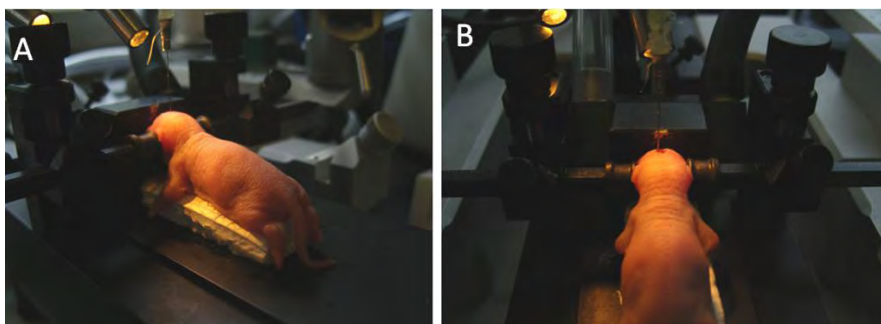


Fig. 1 Diferentes vistas de la lesión estereotáxica de los animales. Se puede apreciar la técnica de montaje del animal, el tipo de inyector utilizado, el adaptador para neonatos, además de la mascarilla

que forma parte del sistema de anestesia inhalada. En la parte A se aprecia se una vista diagonal mientras que en la parte B se presenta una vista antero posterior del animal.

Grupos de estudio

El total de animales lesionados en el presente trabajo fue de 26, se dejaron 7 animales intactos, 12 fueron trasplantados con las células y otros 12 con medio N2 como control de la técnica de trasplante.

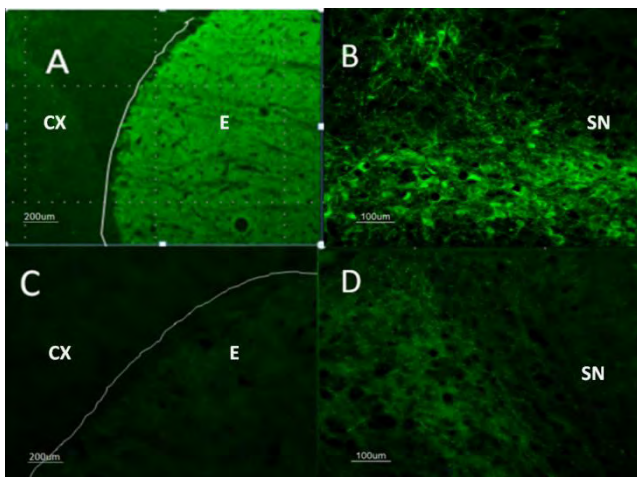
Análisis estadístico

Todos los valores obtenidos en las distintas determinaciones se expresaron como el valor promedio +/- el error estándar de la media (SEM) por sus siglas en inglés. Se comprobó si los datos se ajustaban a una distribución normal. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía y posteriormente una prueba pos-hoc Tukey de comparación múltiple para determinar si los grupos analizados en las pruebas conductuales presentaban diferencias estadísticamente significativas, considerándose un valor de significancia menor al p 0.05.

RESULTADOS

Lesión

La lesión fue corroborada por medio de inmunohistoquímica para TH a los 21 días post lesión. Los animales control o intactos presentaron inmunorreactividad elevada, mientras los que en los animales lesionados la reactividad fue prácticamente nula. Dos son las regiones de interés en la lesión de NDAs con la neurotoxina, una de ellas es donde se encuentran los somas de estas neuronas, la SN pars compacta. La otra es el estriado, región en donde se proyectan las eferencias de las NDAs. Estas dos estructuras son mostradas en la figura 2. Estos resultados muestran que la lesión con la neurotoxina se realizó de manera satisfactoria, por lo que se esperaría que los animales lesionados presentaran una conducta de hiperactividad.



y 40X para la SN (B y D).

Fig. 2 Inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa, en la SN pars compacta y del estriado (E) de animales lesionados y no lesionados. La figura A y B corresponden a animales controles, en la A se observa un estriado con una alta inmunorreactividad a diferencia de la corteza (CX), y en la B la SN pars compacta, en donde se pueden apreciar claramente tanto los somas como las proyecciones de las NDAs. En contraste las figuras C y D muestran que ni en el estriado de los animales lesionados (C) ni la SN pars compacta (D) presentan la reactividad. La figura D presenta una muy ligera reactividad, sin embargo ésta es mínima en contraste a la figura B. Las imágenes se tomaron con un aumento de 20X para el caso del estriado (A y C)

Protocolo de diferenciación

- 1) Se obtuvieron células positivas a TH por medio de las 5 etapas del protocolo, en cada una de ellas recibieron diversas señales para dirigir su diferenciación a NDAs. La morfología de las células fue distinta en cada etapa, tal y como se presenta en la Figura 3, en donde se muestran en campo claro las 4 primeras etapas del protocolo. En la primera imagen se presenta la etapa uno, que consiste en la expansión de las CTE embrionarias, las cuales forman colonias compactas. La siguiente imagen corresponde a la etapa 2, la cual tiene como característica principal la formación de estructuras celulares en flotación denominados cuerpos embrioides, en la imagen se ven dos cuerpos en flotación. La tercera etapa corresponde a la selección de células positivas a nestina, en ella los cuerpos embrioides se adhieren y las células de la periferia comienzan a proliferar como se puede observar en la imagen correspondiente a esta fase. En la fotografía correspondiente a la etapa cuatro se aprecia la expansión de las células que proliferaron en la etapa 3; esta proliferación se da en presencia de factores que promuevan la diferenciación. Por último, la quinta etapa corresponde a la diferenciación hacia neuronas positivas a TH, para esta etapa se presenta una inmunocitoquímica para corroborar que se presenten células positivas a TH y a β III tubulina, lo que demuestra que del protocolo de diferenciación se obtienen neuronas dopaminérgicas. Las figuras presentan una leyenda indicando la etapa a la que corresponde y en el caso de las tres primeras etapas, la característica más importante de ellas.

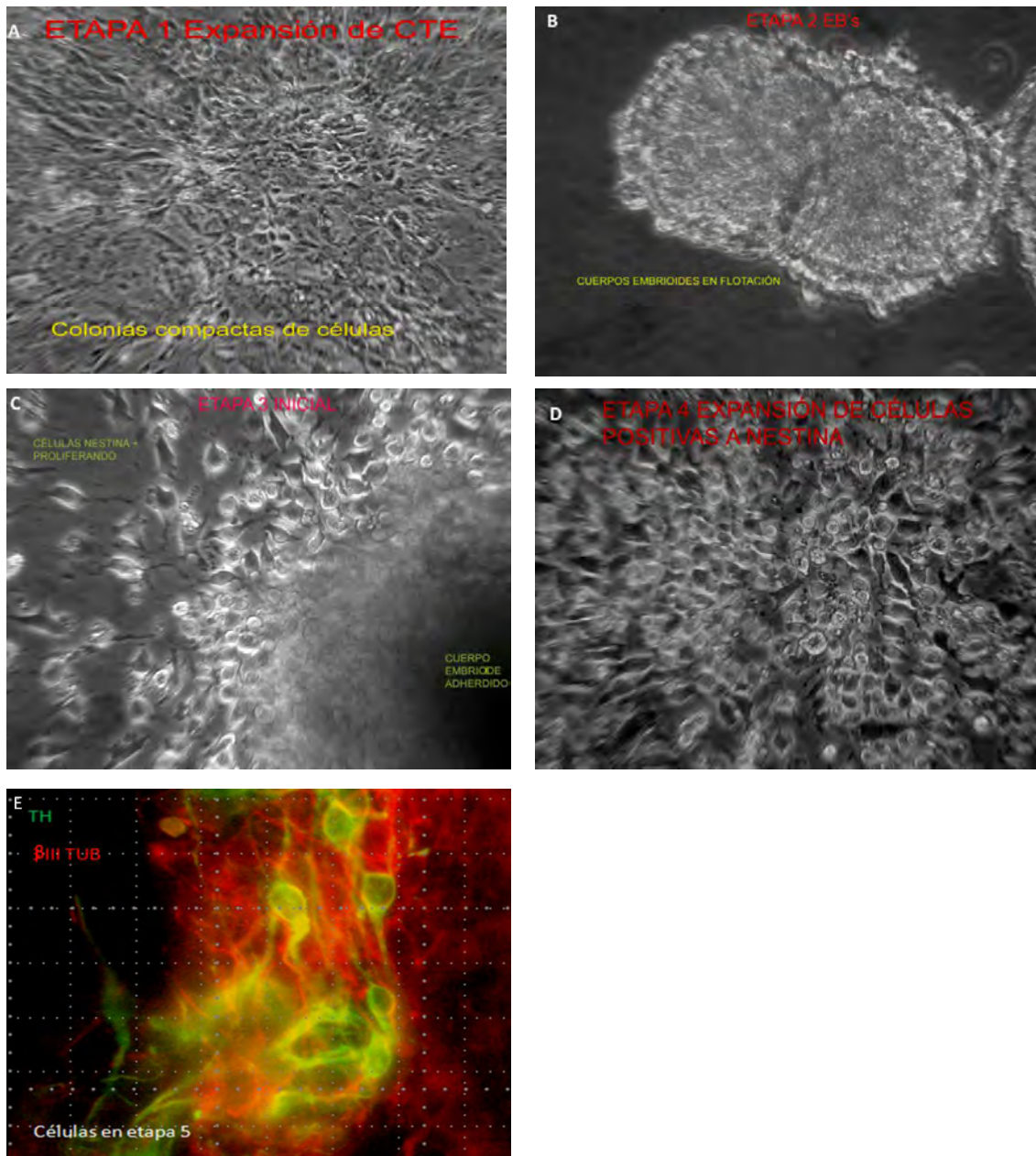


Fig. 3 Morfología de las células en las distintas etapas del protocolo de diferenciación de NDAs a partir de CTE embrionarias de la línea celular R1. En la imagen (A) se presenta la etapa uno, en ella las células forman colonias compactas. En la imagen (B) se muestran dos cuerpos embrioides en flotación que corresponden a la etapa 2. La tercera etapa (C) muestra un cuerpo embriode adherido y cómo las células de la periferia comienzan a proliferar. Estas células se expanden tal y como se observa en la siguiente imagen correspondiente a la etapa 4 (D). Por último en la última imagen (E) se muestra una inmunocitoquímica con el fin de corroborar la presencia de la enzima TH en las neuronas positivas a β III tubulina.

Trasplante

Un total de 12 animales fueron lesionados y trasplantados con las células derivadas del protocolo de diferenciación. Se realizaron inmunohistoquímicas para corroborar la presencia de las células trasplantadas, su localización dentro del tejido cerebral y su morfología. Se utilizó un anticuerpo anti-TH para detectar la presencia de tirosina hidroxilasa, con la finalidad de corroborar la presencia de NDAs en el trasplante. Se utilizó además un anticuerpo anti-M2 para reconocer las células del trasplante, este anticuerpo detecta células provenientes de ratón. Finalmente, se utilizó DAPI para detectar los núcleos.

El trasplante se realizó de manera intranigral; sin embargo algunas de las células del trasplante fueron localizadas en otras zonas además de la SN pars compacta, encontrándose en la corteza cerebral, el estriado y el fascículo medial. Un fenómeno muy común en los trasplantes es que al retirar la cánula se pueden dejar células en el trayecto, en el presente trabajo se observó dicho fenómeno (datos no mostrados), sin embargo en las zonas del estriado, fascículo y corteza donde se encontraron las células no se localizaban cerca del trayecto de la aguja, por lo que piensa en la posibilidad de un fenómeno de migración.

CÉLULAS TRASPLANTADAS LOCALIZADAS EN LA SUSTANTIA NIGRA

En la Figura 4 se aprecia la SN pars compacta, zona en la cual se realizó el trasplante. En la imagen que presenta inmunohistoquímica para TH se puede observar una discontinuidad en el tejido, la cual corresponde a la trayectoria que siguió la aguja en el trasplante, esta es señalada con una flecha roja en la imagen. Al extremo de la discontinuidad en la imagen TH se presenta un orificio señalado con una flecha amarilla, que correspondería al lugar donde las células fueron depositadas, así mismo para ver la correspondencia de esta zona en la imagen DAPI es señalado también con una flecha amarilla. Se aprecia claramente como en la misma zona en donde se presenta el orificio en la imagen para TH, se observa un incremento considerable en la cantidad de núcleos teñidos con respecto a lo observado en el área circundante. Además, el arreglo es claramente distinto, los núcleos están en un ordenamiento propio de un depósito de células y no del arreglo normal de las células en el tejido. Si bien se corroboró que no todos núcleos correspondían a células provenientes del trasplante ya que algunas células eran positivas a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que indica la presencia de células gliales (datos no mostrados), no todos los núcleos en la zona señalada con la flecha amarilla correspondían a células gliales, otro argumento para afirmar que esta zona corresponde al sitio del trasplante que en ninguna otra región del cerebro se presentaba un cúmulo de núcleos similar.

Estas observaciones corroboran que se trata del sitio del trasplante. Otro aspecto a resaltar es la morfología de las células trasplantadas. Aunque esta no es idéntica a la de las NDAs endógenas observadas en los tejidos control, si se logra observar una apariencia de células neuronales y en algunos casos se aprecian pequeñas prolongaciones neuríticas, una de ellas es marcada con una flecha celeste en la imagen TH. También se logran apreciar algunos somas TH positivos

correspondientes a las neuronas trasplantadas (por su colocalización la imagen M2 mostrada en el APÉNDICE I).

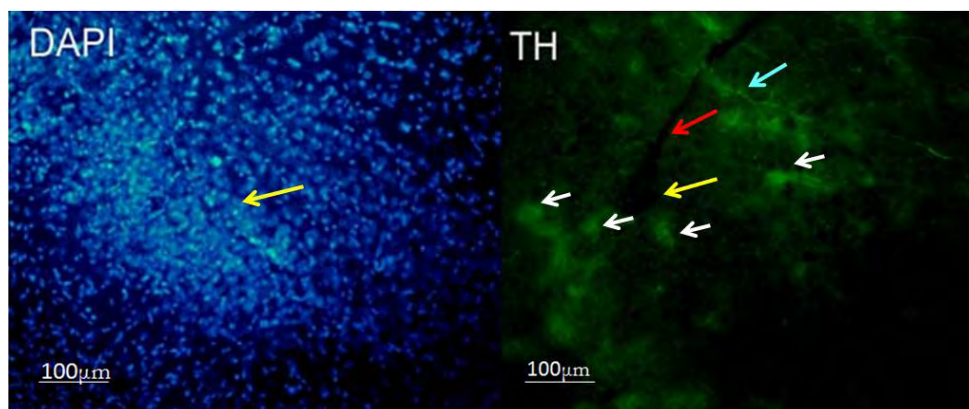


Fig. 4 Trasplante en la SN pars compacta. En la imagen TH se observa la trayectoria que siguió la aguja en el trasplante, señalado con una flecha roja, también es señalado con flechas blancas los somas de las neuronas TH provenientes del trasplante. Se puede apreciar un orificio en el tejido marcado con una flecha amarilla correspondiente al depósito de células. En la imagen DAPI se aprecia un cumulo de núcleos significativamente más denso que los núcleos de la zona aledaña. En la imagen TH

CÉLULAS TRASPLANTADAS LOCALIZADAS EN EL FASCÍCULO MEDIAL

Como ya se mencionó las células trasplantadas se ubicaron en otras regiones además de la SN pars compacta, lo que supondría un fenómeno de migración, una de estas zonas fue el fascículo medial. En animales intactos esta zona contiene las proyecciones de las NDAs que proyectan al estriado. En la Figura 5 se muestra la presencia de las células trasplantadas en el fascículo medial. En la imagen TH se señala con flechas azules la presencia de algunas fibras endógenas positivas a TH. Posiblemente corresponden a fibras que no se dañaron en su totalidad con la toxina. La presencia de estas fibras corrobora que la región corresponde al área del fascículo medial. Se puede observar una reactividad no tan definida como lo observado en células TH endógenas, pero si lo suficientemente claras para identificar células TH positivas provenientes del trasplante, (lo que puede corroborarse con su colocalización con la imagen M2 mostrada en el APÉNDICE I). Algunos somas de estas neuronas trasplantadas son señalados con flechas blancas.

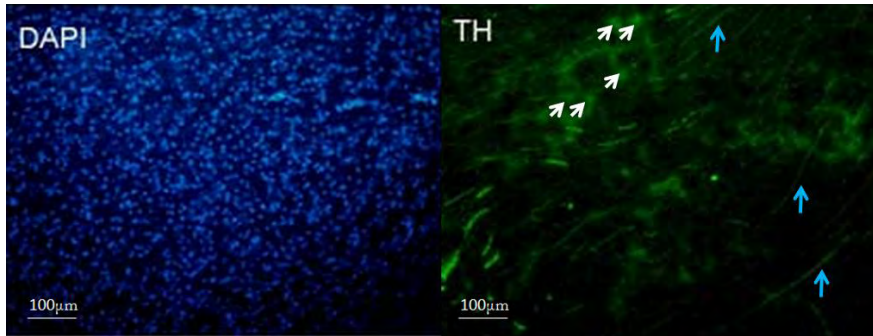


Fig. 5 Células del trasplante ubicadas en el fascículo medial. En la imagen TH se observan las células provenientes del trasplante. Las flechas blancas indican los somas de estas células. En esta fotografía se pueden observar fibras positivas a TH correspondientes a fibras que no fueron lesionadas por completo por la neurotoxina 6-OHDA, estas son señaladas con flechas azules.

CÉLULAS TRASPLANTADAS LOCALIZADAS EN EL ESTRIADO

Otra zona en la cual se localizaron las células provenientes del trasplante fue el estriado. Región a la cual las NDA de la SN pars compacta proyectan sus eferencias. En la Figura 6 se muestran la localización de células del trasplante en el estriado. En la imagen se puede observar la morfología característica de esta zona, la presencia de “estrías” razón por la cual lleva este nombre dicha región. En la imagen TH se presenta la morfología de las neuronas trasplantadas. Para localizar de manera más fácil las células, algunas de ellas se señalan con flechas.

Cabe señalar que el estriado presenta una ligera inmunorreactividad si se compara con el tejido aledaño, sin embargo no se compara con intensidad de una reactividad en un animal intacto, es decir a pesar de presentar esta inmunorreactividad el animal correspondiente a la imagen mostrada presentó todas las características de un animal lesionado, como una conducta de hiperactividad.

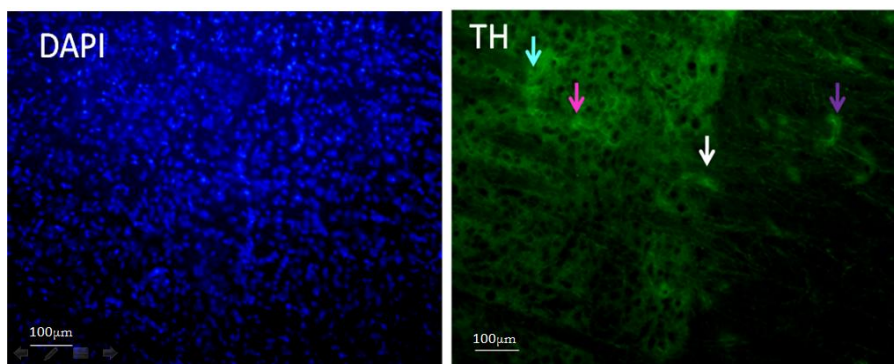
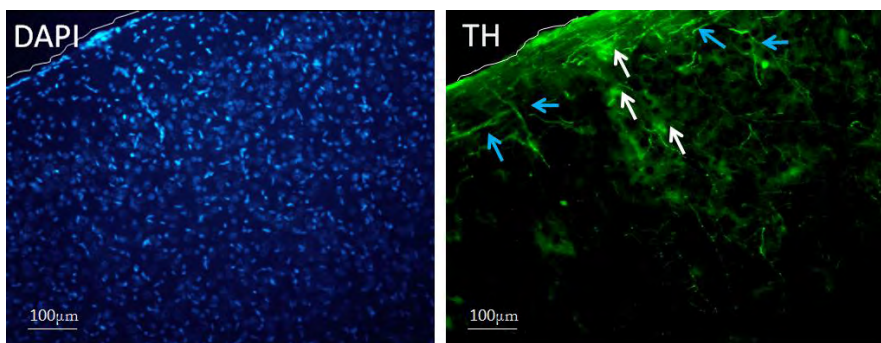


Fig. 6 Células del trasplante ubicadas en el estriado. En la imagen se observan las células positivas a TH provenientes del trasplante para su mejor identificación los somas son señalados con flechas de distintos colores. Se pueden observar las estrías características de la región del estriado. Para una mejor distinción de las células del trasplante estas se marcan con flechas.

CÉLULAS TRASPLANTADAS LOCALIZADAS EN LA CORTEZA

A)



B)

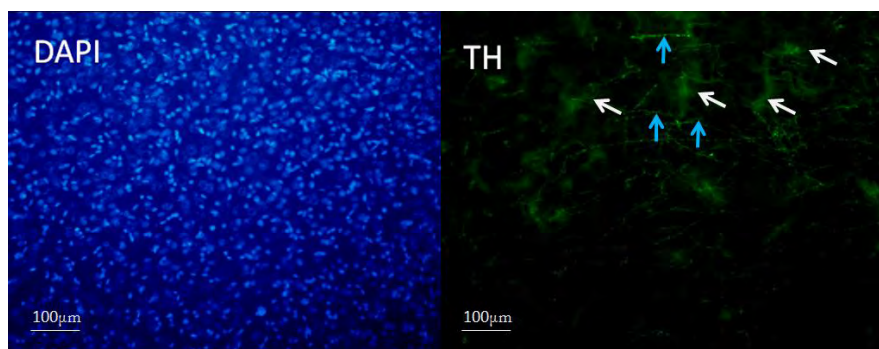


Figura 7. Localización de las células del trasplante en la corteza. En la primera imagen (A) se observa el límite del tejido cerebral el cual está marcado con una línea blanca. En ambas figuras se observan células positivas a TH. Los somas están señalados con flechas blancas. En la imagen (B) se

puede apreciar que las células no se localizaron únicamente en la periferia de la corteza sino también al interior de esta. Se marcaron con flechas azules pequeñas fibras positivas a TH. (B)

En la Figura 7 se observan las células del trasplante localizadas en la corteza. Se puede apreciar el límite del tejido cerebral, este termina en la región superior izquierda donde se presenta un región completamente oscura. Para una mejor observación el límite se ha marcado con una línea blanca. En ambas Figuras se aprecian células positivas a TH provenientes del trasplante (lo que puede corroborarse con su colocalización con la imagen M2 mostrada en el APENDICE I). La morfología fue similar a lo descrito anteriormente, en la Figura 7a se observa de mejor manera los procesos neuríticos.

Pruebas Conductuales de Actividad espontánea en campo abierto

La lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal en los neonatos fue corroborada conductualmente por pruebas de actividad espontánea en campo abierto. De acuerdo a lo reportado previamente por otros autores, este tipo de lesión se asocia a una conducta de hiperactividad. La evaluación conductual se realizó a los 21 días postnatales. Los animales no lesionados presentaron un comportamiento exploratorio los primeros minutos de la prueba, esta conducta corresponde generalmente a recorrer la periferia del área, posteriormente los animales

permanecían en una esquina y no realizaban mayores movimientos, o si los hacían eran mínimos Figura 8B.

En contraste, el patrón conductual de los animales lesionados era marcadamente diferente. Los movimientos iniciales no eran propios de una conducta exploratoria, en lugar de ello fueron mucho más rápidos, y no eran predecibles, es decir no seguían una trayectoria definida sino una desordenada. Otra diferencia notoria fue que los movimientos de los animales intactos únicamente se daban en la periferia y muy pocos eran los que cruzaban por en medio, mientras que los movimientos de los animales lesionados abarcaban prácticamente toda el área Figura 8A.

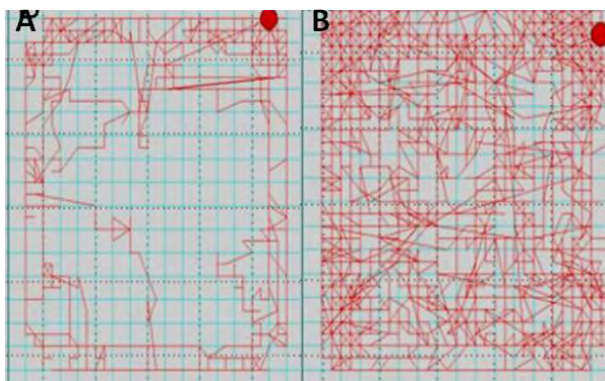


Figura 8. Actividad espontánea de campo abierto. (A) Patrón conductual de un animal control, la línea roja representa la trayectoria del animal, esta se da preferentemente en la periferia del área, en contraste a lo observado en la imagen (B) que ejemplifica la conducta de un animal lesionado, se observa que el recorrido abarcó toda el área. Lo cual denota una conducta de hiperactividad y una mayor distancia recorrida por parte del grupo lesionado.

La diferencia entre ambos patrones conductuales corresponde a un conjunto de variables conductuales que forman parte de la actividad espontánea y que son diferentes entre ambos animales. La cámara de actividad ofrece la posibilidad de registrar diversas variables durante el análisis conductual que nos permiten analizar con mayor detalle las diferencias en aspectos específicos de la conducta espontánea entre animales intactos y lesionados. Estas variables son: distancia recorrida, movimientos estereotipados, conteos verticales, conteos ambulatorios, tiempo ambulatorio y tiempo en reposo.

Se evaluaron a 4 grupos, el primer grupo comprendió los animales no lesionados (grupo control), es decir que no fueron lesionados ni trasplantados, el grupo lesionados aquellos que únicamente recibieron la neurotoxina 6-OHDA, el grupo trasplantado consistió de animales lesionados y que recibieron las células, y el grupo sham animales que fueron lesionados y en lugar de ser trasplantados con las células recibieron únicamente el vehículo con el cual son trasplantadas las células, medio N2.

Distancia recorrida

La distancia recorrida se refiere al tramo en longitud recorrido por el animal por un tiempo de 30 minutos en la cámara de actividad que comprende un área de 43 cm². La distancia total recorrida se mide en cm y comprende la sumatoria de distancias de todos los movimientos realizados por la rata. Un animal que registre una distancia estadísticamente mayor a la de un sujeto control se clasifica como hiperactivo, la cual es una característica de un animal neonato lesionado satisfactoriamente (Avale et al., 2004; Concannon y Schechter, 1979; Davids et al., 2002; Luthman, 1993).

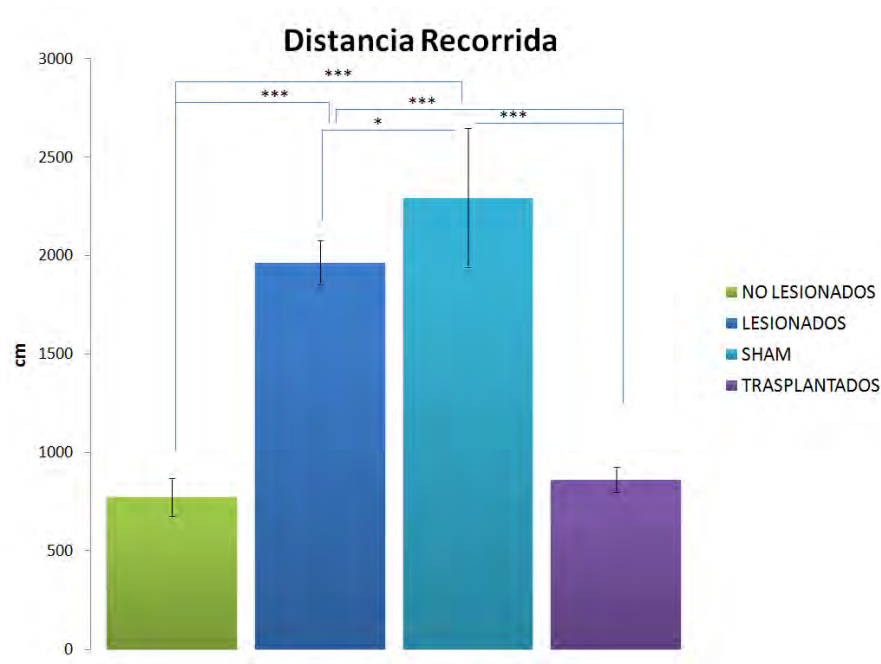


Figura 9. Distancia total recorrida por un periodo de 30 minutos en la cámara de actividad. Los valores basales correspondientes al grupo no lesionado son significativamente diferentes al grupo lesionado y sham, indicando que los animales que recibieron la toxina mostraron un patrón conductual distinto asociado a una conducta de hiperactividad. Aquellos que fueron trasplantados disminuyeron significativamente la distancia recorrida con respecto al grupo sham y lesionado, además de no presentarse valores estadísticamente distintos con respecto al grupo no lesionado indicando una recuperación conductual satisfactoria. Los valores se expresan como el valor promedio +/- el SEM (barras de error). ANOVA ($F_{3,53} 28.72$, $p < 0.05$) seguida de una prueba Tukey.

En la Figura 19 se puede apreciar que el grupo de animales lesionados y sham presentaron incremento significativo con respecto al grupo control. Por otra parte, el grupo trasplantado presentó valores significativamente más bajos en cuanto a la distancia recorrida al grado de no haber diferencias con respecto a los niveles basales del grupo control.

Movimientos Estereotipados

Otra característica conductual de los animales lesionados es un incremento sustancial de los movimientos estereotipados, los cuales se definen como movimientos rápidos, involuntarios y no coordinados de un grupo de músculos relacionados, que no tienen finalidad. Un ejemplo burdo de ello son los “tics” (en humanos), aunque estos son de una muy baja severidad a diferencia de los movimientos que se presentan en animales lesionados. La cámara de actividad registra los movimientos estereotipados como el número de veces que el animal rompe los haces de luz infrarroja en un área reducida (16 cm²), esto refleja movimientos repetitivos no controlados. Los resultados son arrojados automáticamente por la cámara como número de movimientos estereotipados en un período de 30 minutos.

En la Figura 20 se aprecia que los grupos lesionado y sham presentaron mayor cantidad de movimientos estereotipados con respecto a los niveles del grupo control. Al igual que en la gráfica de la distancia total recorrida el grupo trasplantado manifestó una mejoría conductual considerable alcanzando valores próximos a los normales.

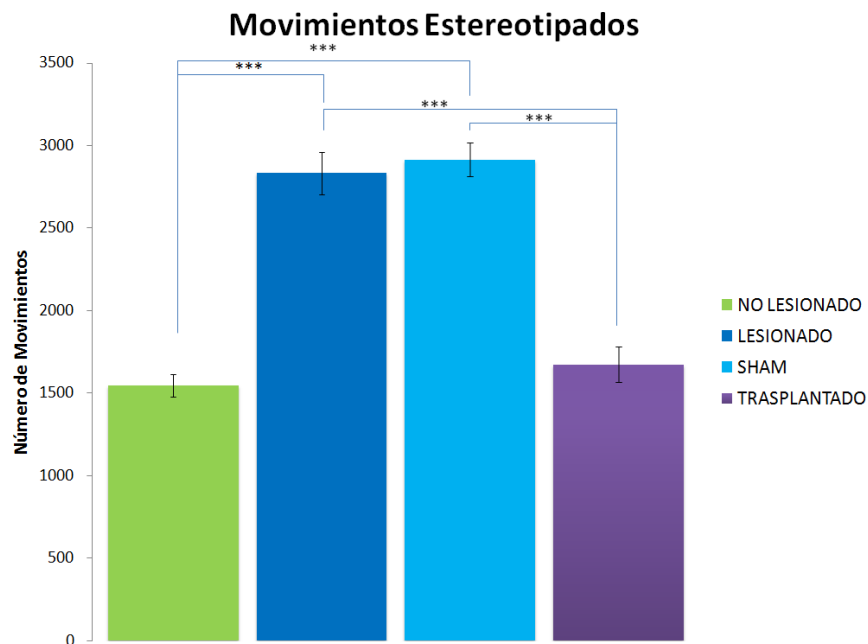


Figura 10. Movimientos estereotipados por un periodo de 30 minutos en la cámara de actividad. Los valores basales correspondientes al grupo no lesionado son significativamente diferentes al grupo lesionado y sham, indicando que los animales que recibieron la toxina mostraron un patrón conductual distinto asociado a una conducta de hiperactividad. Aquellos que fueron trasplantados disminuyeron significativamente los movimientos estereotipados con respecto al grupo sham y lesionado, además de no presentarse valores estadísticamente distintos con respecto al grupo no lesionado indicando una recuperación conductual satisfactoria. Los valores se expresan como el valor promedio +/- el SEM (barras de error). ANOVA ($F_{3,54} 23.77$, $p < 0.05$) seguida de una prueba Tukey.

Conteos Verticales

Otro parámetro conductual que difiere entre los grupos es el que se refiere a los conteos verticales, éstos se refieren a la cuantificación del número de veces que el animal rompe haces de

laser en un eje z en la cámara de actividad, lo que se interpreta conductualmente como las ocasiones en que el sujeto de estudio se levanta sobre sus extremidades posteriores y se coloca en posición vertical. Se presume que un animal no lesionado tenderá a presentar menor actividad con respecto a uno lesionado, como ya se ha mencionado anteriormente, y a permanecer un mayor tiempo en un solo punto. Una consecuencia de permanecer más tiempo en una sola ubicación es el incremento de movimientos verticales. Por ello un animal no lesionado tendrá un mayor número de conteos verticales en comparación con uno que si lo esté.

La gráfica Figura 11 se observa que el grupo de animales no lesionados registró el mayor conteo de movimientos verticales. Los sujetos lesionados y sham prácticamente obtuvieron el mismo resultado, el cual fue mucho menor que los niveles del grupo control, sugiriendo que estos animales en lugar de permanecer apoyados sobre sus dos extremidades posteriores en posición vertical pasaron una mayor cantidad de tiempo en movimiento. Y finalmente los animales trasplantados mostraron un aumento en el número de conteos verticales aunque no fue tan marcado como lo registrado en los dos patrones conductuales anteriores (distancia recorrida y movimientos estereotipados). A pesar de ello, esta recuperación fue significativa.

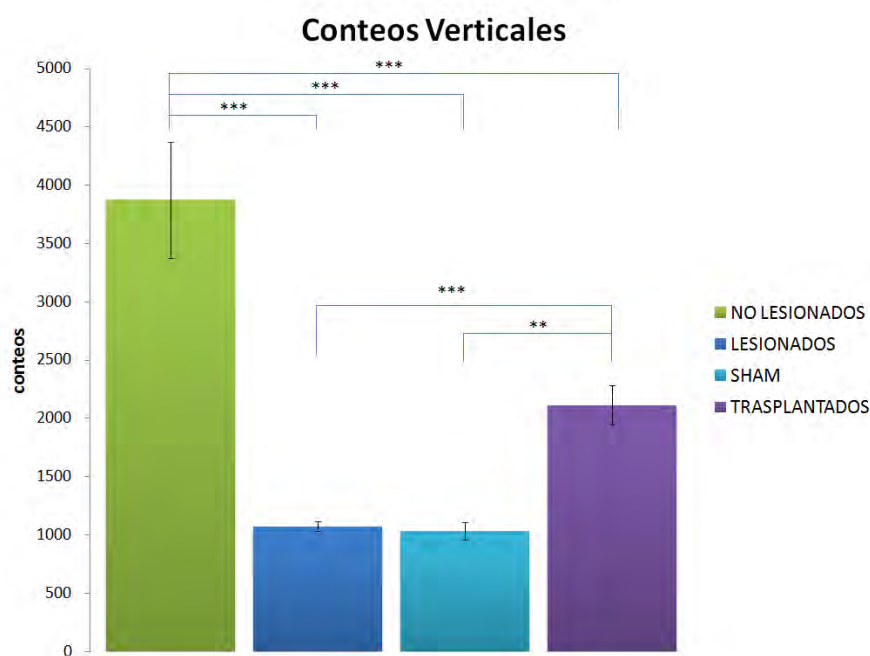


Figura 11. Conteos Verticales por un periodo de 30 minutos en la cámara de actividad. Los valores basales correspondientes al grupo no lesionado son significativamente diferentes al grupo lesionado y sham, indicando que los animales que recibieron la toxina mostraron un patrón conductual distinto asociado a una conducta de hiperactividad. Aquellos que fueron trasplantados aumentaron significativamente los conteos verticales con respecto al grupo sham y lesionado, sin embargo se presentaron valores estadísticamente distintos con respecto al grupo no lesionado indicando una recuperación conductual parcial. Los valores se expresan como el valor promedio +/- el SEM (barras de error). ANOVA ($F_{3,54} 33.56$, $p < 0.05$) seguida de una prueba Tukey.

Conteos Ambulatorios

Los conteos ambulatorios se refieren a la cantidad de veces que el animal rompe un haz laser de la cámara de actividad mientras realiza movimientos ambulatorios. Los movimientos ambulatorios son aquellos que se realizan entre los periodos de descanso, es decir aquellos que se realizan de manera continua sin descanso. Un animal mientras más activo se encuentre tenderá a estar menos tiempo en reposo y por ello presentará una mayor cantidad de movimientos ambulatorios y por ende conteos ambulatorios. Es así que un animal lesionado registrará una mayor cantidad de conteos ambulatorios en contraste con uno intacto.

En la Figura 22 se puede apreciar que los animales intactos registraron muy pocos conteos ambulatorios debido a permanecieron la mayor cantidad de tiempo en reposo y por ello sus movimientos ambulatorios fueron mínimos. Los animales lesionados y sham que presentaron una conducta de hiperactividad registraron mayor número de movimientos ambulatorios, mientras que los animales trasplantados mostraron una recuperación significativa. Aunque los datos de la recuperación conductual no estuvieron tan próximos de los niveles control como lo que se presentaron en otros parámetros (movimientos estereotipados y distancia recorrida) la recuperación fue con respecto a los grupos lesionados y sham.

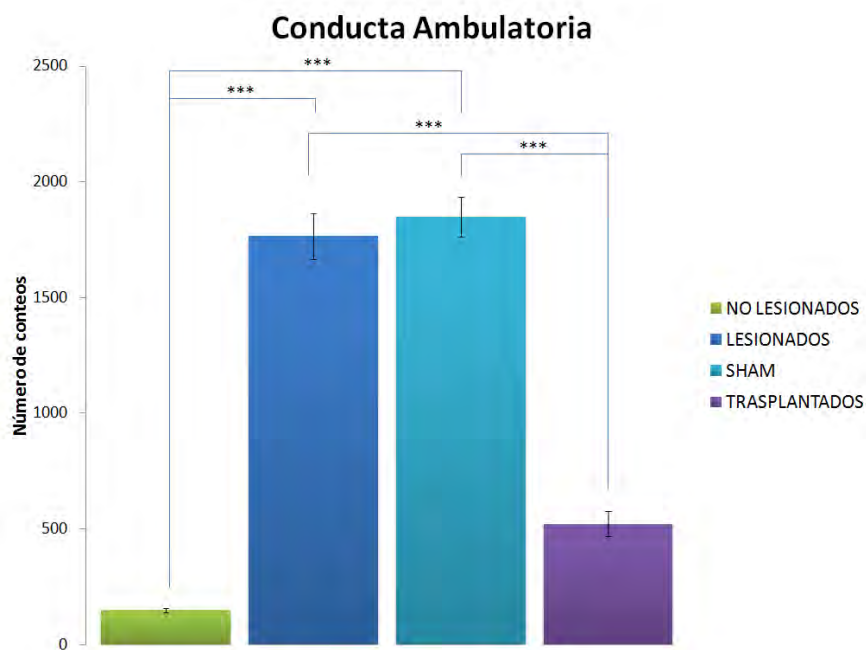


Figura 12. Conteos Ambulatorios por un periodo de 30 minutos en la cámara de actividad. Los valores basales correspondientes al grupo no lesionado son significativamente diferentes al grupo lesionado y sham, indicando que los animales que recibieron la toxina mostraron un patrón conductual distinto asociado a una conducta de hiperactividad. Aquellos que fueron trasplantados disminuyeron significativamente los conteos ambulatorios con respecto al grupo sham y lesionado, además de no presentarse valores estadísticamente distintos con respecto al grupo no lesionado indicando una recuperación conductual satisfactoria. Los valores se expresan como el valor promedio +/- el SEM (barras de error). ANOVA ($F_{3,54} 57.51$, $p < 0.05$) seguida de una prueba Tukey.

Tiempo ambulatorio

El tiempo que un animal realiza movimientos ambulatorios es un indicador del grado de actividad motriz que este presenta. La cámara de actividad registra el tiempo ambulatorio como la suma de los tiempos durante los cuales el animal se encuentra en actividad continua.

En la Figura 23 se puede observar que los animales no lesionados presentaron un tiempo ambulatorio mínimo, en contraste con los animales lesionados y sham, que tuvieron un tiempo ambulatorio significativamente mayor.

Por otra parte, el tiempo ambulatorio del grupo trasplantado mostró una recuperación conductual al reducir el tiempo ambulatorio casi a los niveles del grupo control.

Tiempo en reposo

El tiempo que el animal se encuentra inactivo o en reposo es cuantificado por la cámara de actividad y nos indica el grado de actividad de un animal, lo que es un importante parámetro para saber el grado de lesión y recuperación tras el trasplante. Un animal no lesionado tendrá mayor tiempo en reposo con respecto a uno lesionado que por presentar comúnmente la característica de hiperactividad se esperaría que el tiempo de reposo fuera mínimo. Esto corresponde a lo observado en la Figura 24, en la que se observa que aunque la diferencia entre los grupos no es tan marcada como lo registrado en los otros parámetros conductuales si se logran apreciar cambios significativos. Siendo los animales no lesionados los de mayor tiempo en reposo y los lesionados y grupo sham los que presentaron mayor actividad. El grupo de trasplantados mostró una recuperación conductual al incrementar el tiempo de reposo con respecto al grupo lesionado y sham.

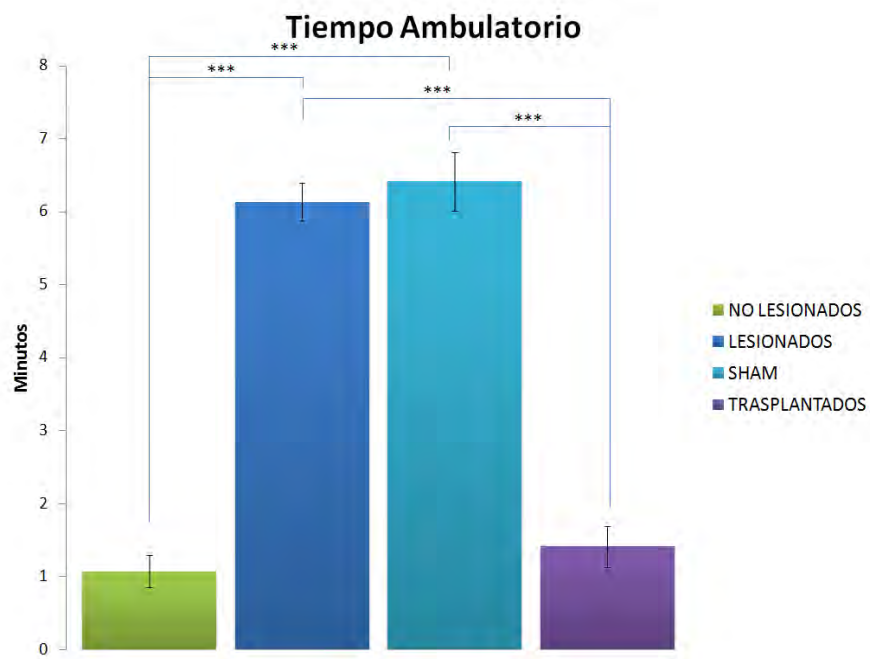


Figura 13. Tiempo Ambulatorio por un periodo de 30 minutos en la cámara de actividad. Los valores basales correspondientes al grupo no lesionado son significativamente diferentes al grupo lesionado y sham, indicando que los animales que recibieron la toxina mostraron un patrón conductual distinto asociado a una conducta de hiperactividad. Aquellos que fueron trasplantados disminuyeron significativamente con respecto al grupo sham y lesionado, además de no presentarse valores estadísticamente distintos con respecto al grupo no lesionado indicando una recuperación conductual satisfactoria. Los valores se expresan como el valor promedio +/- el SEM (barras de error). ANOVA seguida de una prueba Tukey.

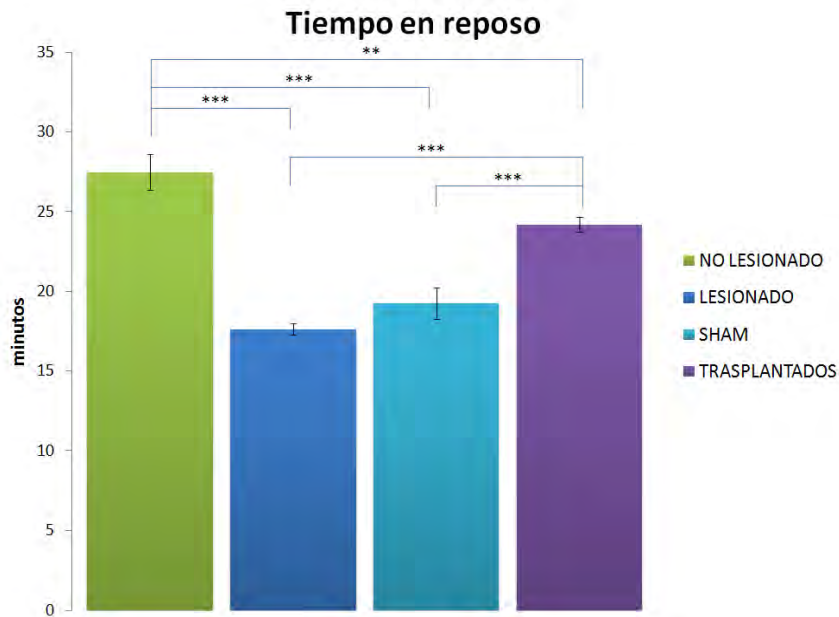


Figura 14. Tiempo en Reposo por un periodo de 30 minutos en la cámara de actividad. Los valores basales correspondientes al grupo no lesionado son significativamente diferentes al grupo lesionado y sham, indicando que los animales que recibieron la toxina mostraron un patrón conductual distinto asociado a una conducta de hiperactividad. Aquellos que fueron trasplantados aumentaron significativamente el tiempo en reposo con respecto al grupo sham y lesionado, y no presentaron valores estadísticamente distintos con respecto al grupo no lesionado. Los valores se expresan como el valor promedio +/- el SEM (barras de error). ANOVA ($F_{3,54} 60.59$, $p < 0.05$) seguida de una prueba Tukey.

DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas de inmunohistoquímicas demuestran la presencia y la localización de las células trasplantadas en los animales lesionados. Además de ello, se demuestra que los animales trasplantados mostraron una mejoría conductual en contraste con los animales lesionados y sham. El nivel de recuperación conductual fue tal que en varios parámetros conductuales se alcanzaron niveles muy cercanos a los que presentaron los sujetos intactos.

Se discutirá primeramente la relación que tiene el presente trabajo con la EP, posteriormente serán discutidos los resultados correspondientes al trasplante de las células derivadas del protocolo de diferenciación y por último se correlacionará con los datos conductuales.

Cabe aclarar que los artículos con los que se comparan nuestros resultados son de la década de 1980 y 1990 en su mayoría, ello se debe a que son los únicos antecedentes directos con los que pudiéramos discutir de mejor manera los resultados, ya que los trabajos recientes en modelos neonatos están enfocados al estudio de otras patologías, así como otros fenómenos biológicos. Esta observación nos reitera la necesidad de estudiar más a detalle este modelo con aplicaciones a enfermedades neurodegenerativas como la EP, así como probar experimentalmente en este modelo alternativas terapéuticas que no se contaban con anterioridad en la época en la que se realizaron los estudios correspondientes a nuestros antecedentes directos, como es el caso del uso de NDAs provenientes de un protocolo de diferenciación a partir de células troncales.

Relación entre el modelo neonato y la EP

La EP como ya se ha mencionado en la introducción es una enfermedad neurodegenerativa que se presenta en su mayoría en personas de edad avanzada las cuales tienen un cerebro maduro. El cerebro en esta etapa de desarrollo presenta ciertas características que le distinguen de un cerebro joven o neonato. Se sabe que el ambiente en un cerebro adulto es adverso para el crecimiento axonal, es decir impide que las células presentes extiendan libremente sus axones, esto es debido a varias razones, unas de ellas es que ya no se encuentran presentes los factores tróficos que favorecían el crecimiento axonal así como las moléculas que guiaban este crecimiento. Esto es porque al estar ya formadas todas las zonas del cerebro se han apagado todos los eventos que se encontraban activos en la etapa del desarrollo y la etapa neonata. La relación que tiene todo ello con la EP es que al intentar terapias como la de reemplazo celular es particularmente difícil que las células trasplantadas sobrevivan y sean totalmente funcionales. A pesar de que se han logrado grandes avances en modelos animales adultos de la EP, aún no se encuentran las condiciones adecuadas para que se logre un trasplante totalmente eficiente. Una alternativa en la búsqueda de las condiciones necesarias para que se logre esto es el estudio de un modelo neonato lesionado de la vía nigroestriatal. Al tener un ambiente permisivo para el crecimiento axonal el cerebro neonato es particularmente interesante observar como este ambiente influye en un trasplante similar al que se realiza en modelos adultos. Determinar si existe alguna diferencia en cuanto a la recuperación de los animales, así como la distribución de las células. Se esperaría que hubiera una mejor recuperación en animales trasplantados neonatos en contraste a lo reportado con animales trasplantados adultos.

En el presente trabajo se encontró que la recuperación conductual era estadísticamente significativa, lo cual indica que el ambiente del cerebro joven está promoviendo una mejor respuesta de las células trasplantadas. El siguiente paso sería discernir qué elementos de este ambiente estarían específicamente ayudando a las células trasplantadas. Esto con la finalidad de poder trasladar de alguna forma estos elementos a trabajos en modelos de animales adultos de la EP e intentar mejorar los resultados en este modelo, es decir aumentar su supervivencia e integración. Para que en algún futuro se tengan más elementos para decidir si la terapia de reemplazo celular es viable para aplicarse a pacientes con EP.

Trasplante

Una de las características principales del trasplante fue que las células no presentaban una organización en cúmulos compactos como se reporta en trasplantes en animales adultos, en lugar de ello tendían a dispersarse en distintas zonas del cerebro. A pesar de no haber realizado estudios que corroboraran migración de las células trasplantadas un argumento que apoya esto es que a pesar de que en la región correspondiente al trayecto de la cánula se registró la presencia de algunas células, producto de que al retirar la cánula se depositaron algunas células en el camino; las células que se encontraron en la corteza, el estriado y el fascículo medial no se encontraban cercanas a la trayectoria de la cánula, esto sugiere la posibilidad de que el cerebro joven pudo haber propiciado un fenómeno de migración de las células trasplantadas.

Los resultados de nuestro trabajo concuerdan a lo reportado por varios grupos de trabajo en lo correspondiente a la descripción morfológica y localización de las células del trasplante en un modelo neonato depletado de dopamina mediante 6-OHDA. Las explicaciones y argumentos que se dan en estos trabajos que obtuvieron resultados similares a los nuestros nos podrían ser de gran ayuda para lograr entender el comportamiento de las células.

Diversos autores reportan la ausencia de agregados por parte de las células trasplantadas y migración celular como es el caso del trabajo realizado por Herman en 1991, quién lesionó con 6-OHDA a ratas adultas y neonatas, posteriormente trasplantó a los animales con células precursoras dopaminérgicas mesencefálicas provenientes de embriones de ratas. El trasplante fue de manera intraestriatal. Herman describe que las células trasplantadas en neonatos presentaban una tendencia a migrar del sitio de inyección en contraste a lo que observó en adultos, en los que reportó que las células se organizaban en cúmulos ubicados en el sitio de trasplante. En su trabajo reportó que la mayoría de las células trasplantadas en neonatos se localizaron lejos del sitio de trasplante. Las regiones en donde encontró células del trasplante fueron: en el cuerpo calloso, regiones adyacentes al ventrículo lateral, en el ventrículo lateral, hipocampo, septo ventral, así como en la mayoría de las regiones del estriado. Herman discute en su trabajo que la migración de células en neonatos trasplantados en contraste a adultos trasplantados pudiera deberse a diversas causas como el hecho de que en el cerebro neonato los programas de migración se encuentran aún activos, lo que podría contribuir con señales que favorezcan la migración neuronal. Otro aspecto que menciona son las características de la matriz extracelular o la presencia de moléculas de adhesión celular, factores que pudieran impedir que en el cerebro adulto se diera un fenómeno de migración en comparación con un cerebro joven que aún no presenta madurez en estas dos características. Finalmente hace énfasis en factores físicos, discute que en un cerebro neonato se presenta un mayor espacio intercelular, es decir que hay una mayor distancia entre cada células, esto debido a que en el cerebro neonato aún no están formadas todas las conexiones neuronales a diferencia de un cerebro adulto en la que la mayoría de ellas ya están establecidas. Las razones que discute Herman pudieran aplicarse a nuestro trabajo, sin embargo no se han realizado estudios al respecto que comprueben, refuten o aporten nuevas explicaciones. Por ello, realizar este tipo de estudios ayudaría a entender el comportamiento de células trasplantadas en un ambiente de un cerebro neonato.

Herman describió además que las células trasplantadas en neonatos mostraban una morfología en la que presentaban abundantes procesos axonales, lo que difiere a nuestros resultados ya que no se observaron de manera clara estos procesos y mucho menos de forma abundante. Ello pudiera deberse a la fuente celular de los trasplantes. Herman trabajó con células precursoras dopaminérgicas mesencefálicas provenientes de embriones de ratas a diferencia de las células utilizadas en nuestro trabajo en el que se utilizaron células derivadas de un protocolo de diferenciación. Las ventajas de utilizar como fuente celular de los trasplantes células derivadas de CTE en contraste a células provenientes de cultivo primario es la disponibilidad de donadores, además de cuestiones éticas. Otra razón por la cual se podría explicar la diferencia en los procesos neuríticos reportados por Herman en comparación con nuestro trabajo pudiera deberse a que dicho autor evaluó los cerebros de 7 a 9 meses post lesión en contraste a lo realizado en nuestro trabajo que la evaluación se realizó a los 21 días post lesión. Herman atribuye que una mejor inervación de las células trasplantadas en los neonatos pudiera darse por una mayor cantidad de factores tróficos en el estriado neonatal. Sin embargo, también reporta una menor supervivencia de las células trasplantadas en neonatos en comparación con adultos, otros autores han reportado lo mismo, sin embargo ninguno da una explicación clara del por qué se produce dicho fenómeno. A pesar de ello las pruebas conductuales realizadas, demuestran que los animales que recibieron trasplante neonatal se recuperaron de mejor manera que los animales trasplantados en una etapa adulta. Esto pudiera indicar que en lo correspondiente a una recuperación conductual de un animal neonato lesionado mediante 6-OHDA el número de células que sobreviven en un trasplante tiene una menor importancia en comparación al número de células que logran desarrollar procesos axonales y llegan a inervar la zona deseada. Debido a que en nuestro trabajo el período de evaluación post trasplante fue muy corto no se pudo determinar si las células presentaban procesos axonales definidos y a que zonas pudieran estar inervando, es por ello que sería interesante realizar estudios en el modelo neonato en el que el periodo de evaluación post trasplante sea mayor.

Por otra parte Carder y Snyder-Keller en 1987 reportaron de igual manera una mayor inervación por parte de precursores mesencefálicos obtenidos de embriones de rata trasplantados en ratas jóvenes menores a una semana lesionadas con 6-OHDA, en comparación a trasplantes en animales adultos. El trasplante lo realizaron de manera intraestriatal y reportan que las células inervan por completo el estriado y crecen de mejor manera que las células trasplantadas en animales adultos. Aunado a ello mencionan que los animales neonatos lesionados presentaron menores problemas motores que los animales adultos lesionados, estos autores atribuyen que la edad del sujeto influye notablemente en la respuesta de las células trasplantadas y en la repercusión motora que el trasplante pudiera tener. Ya que encontraron una mejoría conductual mayor en los animales neonatos trasplantados en comparación con los adultos. Esto nos indica que el cerebro neonato presenta una mejor respuesta ante una lesión en comparación con un cerebro adulto, sin embargo en nuestro no se comparó experimentalmente animales lesionados adultos con animales neonatos (si se hubiese realizado esto muy probablemente se hubieran encontrado una mejor respuesta de los animales neonatos), en lugar de ello se pretendió comparar entre animales neonatos trasplantados y no trasplantados. Debido a que los animales trasplantados fueron los que se

recuperaron conductualmente en contraste con aquellos que solo recibieron el vehículo (grupo sham) se puede afirmar que a pesar de que un animal neonato responde de mejor manera ante una lesión en términos de la severidad de los síntomas conductuales, esta respuesta no llega a ser la misma que la conducta de animales intactos, sin embargo si a estos animales se les trasplanta con las células requeridas se pudiera llegar a tener una mejor recuperación, con una conducta muy similar a la de animales intactos.

Butz y colaboradores en el 2009, y Chapman y Mckinnon en el 2000 argumentan que la plasticidad cerebral es la capacidad del cerebro para adaptarse ante elementos que lo alteren ya sean endógenos como es el caso de una patología ó exógenos como lo ocurrido tras una lesión. Ambos grupos concuerdan que hay varios elementos a tomar en cuenta en un proceso de recuperación cerebral como lo es el tipo de patología o las características de la lesión, el área del cerebro afectada, el tiempo del elemento perturbador, entre otras. Sin embargo, ambos grupos hacen hincapié en que la edad de un cerebro es un elemento crucial para un proceso de recuperación, mientras más joven es el cerebro se ha demostrado que tiene una mayor capacidad regenerativa; es decir que un cerebro más joven presenta características tales que le brindan una mayor plasticidad. Esto fue establecido por el principio de Kennard (Dennis, 2010), el cual manifiesta que mientras más joven sea el cerebro mejor y más rápida será la recuperación de este tras una lesión. Esto nos indica que procesos de plasticidad podrían explicar los resultados obtenidos por diversos grupos de trabajo en los cuales se observa una mejor inervación de las células trasplantadas y una mayor recuperación conductual en animales neonatos trasplantados en comparación con animales adultos.

Estos argumentos concuerdan con lo reportado por Sable y colaboradores en 1997, quienes señalan en su trabajo que la edad del tejido hospedero (el que recibe las células del trasplante) juega un importante papel en el crecimiento, maduración y distribución de las células trasplantadas. Este grupo trasplantó células provenientes del mesencéfalo ventral de fetos de 15 días de gestación en el estriado de animales adultos intactos, lesionados y neonatos intactos. Este grupo reportó que en los sujetos adultos intactos el trasplante se delimitaba a una sola región y que las células presentaron una organización en la que se formaba una masa celular bastante densa, además de que estas células estaban claramente aisladas de las células endógenas. En las ratas adultas lesionadas las células trasplantadas se integraron de mejor manera, lo que atribuyeron a que un tejido dañado pudiera emitir señales que promuevan el crecimiento celular. Sin embargo, encontraron que en los animales neonatos el trasplante se extendió e integró de mejor manera, además de que se presentaron abundantes procesos neuríticos. En todos los grupos se evaluó la reacción glial, siendo el de los neonatos el que menos reacción presentaba. Estos autores explican estos resultados argumentando que los factores de crecimiento pudieran encontrarse de manera más disponible en cerebros neonatos en contraste con cerebros adultos. Mencionan además que las moléculas de adhesión celular neuronal pudieran jugar un papel importante en la migración y maduración de neuronas, así como la formación de procesos neuríticos. Debido a que estas moléculas se encuentran presentes en el cerebro de una rata hasta

los 15 días postnatales pudiera explicar en algún modo la mejor integración celular en los cerebros neonatos.

Por otra parte en nuestros experimentos (datos no mostrados) se observó la presencia de células positivas a GFAP alrededor del sitio de inyección, lo que indica un fenómeno de gliosis causado por la lesión mecánica de la cánula, sin embargo estas no correspondían a la totalidad de los núcleos que presentaban un arreglo de amontonamiento (imagen DAPI de la Figura 4 de los resultados), además de que en esta zona también se detectó la presencia de células positivas a TH que colocalizaban con el marcaje con M2, indicando que eran células provenientes del trasplante. Todo ello nos dice que a pesar de que se presentó un fenómeno de gliosis, el cual es común en procedimientos de trasplantes en el cerebro, muchas de las células mostradas en la imagen DAPI de la Figura 4 de los resultados corresponden a células del trasplante. A futuro se podrían realizar inmunohistoquímicas para GFAP a distintos tiempos para poder observar la progresión de la reacción glial y si esta disminuye con el paso del tiempo.

Abrous y colaboradores en 1993 realizaron un estudio en el que evaluaron el efecto neuroprotector de un trasplante de células de mesencéfalo ventral embrionario en animales neonatos de 1 día postnatal y animales adultos de 2 meses. Estos animales fueron trasplantados en el estriado y posterior al trasplante se les administró la neurotoxina 6-OHDA en el fascículo medial. Al igual que los autores mencionados anteriormente, Abrous y colaboradores reportaron que el trasplante en animales adultos se organizaba como una masa compacta de células delimitadas del tejido endógeno, en comparación con el trasplante en neonatos en donde reportan que las células no formaron una masa definida, sino que migraron en pequeños grupos. Además reportaron una baja viabilidad de las células trasplantadas en neonatos. A pesar de ello encontraron que los animales trasplantados a una etapa neonatal mostraban una mayor destreza motora mediante la prueba “paw reaching” que los animales trasplantados en etapa adulta.

La mayoría de los grupos de trabajos concuerdan que las características y el ambiente de un cerebro joven permiten que este responda de una mejor manera ante una lesión además de permitir que un trasplante de células en el caso de animales lesionados de la vía nigroestriatal cause una mejor recuperación conductual en contraste con trasplantes en animales adultos. Los resultados de nuestro trabajo permiten afirmar que los resultados obtenidos con trasplantes de precursores mesencefálicos se pueden reproducir con trasplantes de NDAs derivadas de un protocolo de diferenciación a partir de células troncales embrionarias. Este es un aspecto bastante relevante ya que como se mencionó en la introducción la terapia de reemplazo celular con base en células diferenciadas a partir de células troncales ha tomado bastante importancia en los últimos años debido a que se puede tener una mayor disponibilidad y número de células requeridas en contraste con los precursores mesencefálicos. Un aspecto muy importante en la diferenciación celular es el conocimiento del desarrollo embrionario de un particular tipo celular. El estudio del desarrollo de las NDAs cobra particular importancia en el establecimiento de protocolos para generar NDAs a partir de CTE. Sin embargo como se describe en la introducción el desarrollo de las NDAs es bastante complejo ya que participan un gran número de moléculas señalizadoras en el desarrollo de cerebro medio como Shh, FGF8, TGF; y posteriormente en la maduración y

especificación de las NDAs mesencefálicas intervienen otro gran número de factores como En1 y 2, Pax 2 y 5, Hes, Otx2, Pitx3, Nurr1, entre otros más. Es por ello que reproducir *in vitro* las condiciones del desarrollo es bastante complejo. No solo se deben de aplicar los factores necesarios sino utilizar el gradiente y en el momento adecuado. Todo esto nos señala que la terapia de reemplazo celular a base de células diferenciadas a partir de células troncales es una opción muy prometedora debido al número de células que se pueden generar *in vitro* es mucho más elevado al que se obtienen de biopsias de mesencéfalo embrionario, además de que no presentan los problemas éticos asociados con la obtención de células a partir de fetos. Sin embargo es necesario continuar el estudio del desarrollo embrionario de las células a trasplantarse, en el caso de la EP las NDAs, para hacer más eficiente los protocolos de diferenciación y así aumentar el porcentaje de células deseadas.

Evaluación conductual

En lo que se refiere a los elementos conductuales de nuestro trabajo, se evaluaron distintos parámetros de la actividad espontánea en campo abierto. Los resultados obtenidos demuestran claramente un incremento de esta actividad en los animales lesionados con respecto a los animales control. Ello concuerda con lo reportado por diversos autores (Descarries et al., 1992; Bishop et al., 2004; Radja et al., 1993; Luthman et al., 1989; Luthman et al., 1985; Joyce et al., 1996; Avale et al., 2004; Erinoff y Snodgrass 1986; Davids et al., 2002; Fernandes et al., 1994; Cunningham et al., 1995; Castañeda et al., 1990) quienes señalan que una lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal en animales neonatos produce un incremento de la actividad espontánea o hiperactividad. Esto se ha asociado a que posterior a la lesión de la vía nigroestriatal en un modelo de neonatal ocurre un aumento en los niveles del neurotransmisor serotonina debido una hiperinervación de fibras serotoninérgicas a nivel del estriado. En nuestro trabajo no se midieron los niveles de este neurotransmisor así como el incremento en las fibras de serotonina, sin embargo en estudios posteriores esta es una de las variables que se tendrían que medir, ya que si la conducta de hiperactividad asociada a la lesión está relacionada con un aumento en la inervación serotoninérgica, sería interesante evaluar si el trasplante al causar una disminución en la hiperactividad estaría de igual manera disminuyendo los niveles de fibras serotoninérgicas.

Autores como Cunningham y colaboradores en el 2005 reportan que en el desarrollo embrionario existe una competencia del sistema dopaminérgico con el serotoninérgico para establecer conexiones sinápticas corticales. Se presume que al depletarse las NDAs y por ende las fibras dopaminérgicas de un animal neonato, las neuronas serotoninérgicas, al no encontrar competencia por los sitios blancos donde hacer sinapsis, tienden a incrementar los sitios de inervación serotoninérgica y los niveles de serotonina. Un elemento que apoya lo anterior es lo planteado por Descarries y colaboradores en 1992 quien menciona que la maduración del sistema dopaminérgico no se da sino hasta 12 o 15 días postnatales, lo que explicaría el por qué de la plasticidad de este sistema en períodos cortos posteriores al nacimiento. De acuerdo con este autor el incremento de serotonina puede llegar a ser el doble o triple de los niveles basales.

La mayoría de estos autores también concuerdan en el hecho de que no se presentan los mismos síntomas motores en los animales neonatos lesionados con 6-OHDA en comparación con animales adultos lesionados. Está bien caracterizado que una lesión bilateral en sujetos adultos puede producir afagia, adipisia, catalepsia o acinesia. El grado en que se presenten estos síntomas dependerá de las características de la lesión, sin embargo es importante resaltar que en los animales neonatos no se producen dichos síntomas, es decir una posterior a una lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal los animales neonatos se ven afectados en menor grado en contraste con los animales adultos.

Castañeda y colaboradores en 1990 mencionan que los animales neonatos tienen menor repercusión motora debido a que las NDAs que quedaron intactas tras la lesión pudieran soportar en alguna medida la demanda de dopamina del cerebro, y que un ambiente favorecedor del cerebro joven podría ser la diferencia con respecto a un cerebro adulto. Esto lo corrobora conductualmente al encontrar post mortem un nivel mayor a lo esperado de DA en el estriado en ratas adultas que fueron lesionadas en etapas neonatales.

En lo que corresponde a la conducta de hiperactividad Fernades y colaboradores en 1994 particularizan que se produce un incremento en la cantidad de movimientos estereotipados. Ello concuerda ampliamente con lo registrado en nuestro trabajo en la cámara de actividad espontánea. En donde se observa claramente en la gráfica correspondiente a este parámetro conductual que las ratas lesionadas y sham presentaron una cantidad considerablemente mayor de estos movimientos con respecto a los animales control.

En los estudios en los que se realizan trasplantes en animales neonatos lesionados con 6-OHDA los parámetros conductuales que se miden son muy limitados. Bishop y colaboradores en 2004 mencionan que deberían tomarse en cuenta otros aspectos de la conducta como los movimientos estereotípicos y distancia total sin embargo ni él ni otros grupos los estudian. Como ya se ha mencionado se reporta un incremento en la actividad espontánea o hiperactividad. Sin embargo la actividad espontánea comprende varios parámetros conductuales que pueden evaluarse. En nuestro trabajo se estudia con mayor profundidad que en estudios previos la actividad espontánea de los animales neonatos lesionados. Se han escogido parámetros que reflejen una diferencia clara entre sujetos lesionados e intactos y que pudieran servir como para evaluar una posible recuperación conductual.

La distancia recorrida es quizás el parámetro de actividad espontánea más claro. Un animal intacto no presentará una conducta espontánea aumentada en contraste con uno lesionado. Esto se muestra en la gráfica correspondiente a este parámetro. En lo que respecta a la evaluación conductual del trasplante para este parámetro se puede apreciar claramente que los animales lesionados que recibieron un trasplante se recuperaron, ya que presentaron valores muy similares al de los animales intactos. En contraste los animales que sham no presentaron recuperación alguna.

La diferencia conductual entre animales lesionados e intactos se presenta en todos los demás patrones conductuales evaluados como es el caso de movimientos estereotipados, conteos

verticales, conteos ambulatorios, tiempo ambulatorio y tiempo en reposo. Los cuales se describen a detalle en el área de resultados. Cada uno de estos parámetros evalúa diversos aspectos de la actividad espontánea. Y la conjunción de los resultados de estos parámetros nos proporciona una mejor valoración de la actividad espontánea de los animales. Nuestros resultados conductuales señalan que la lesión se reflejó de manera conductual en los animales administrados con la neurotoxina 6-OHDA. La conducta de estos animales fue marcadamente distinta al de los animales control quienes tuvieron un patrón de conducta completamente distintos.

La evaluación conductual mostró que los animales trasplantados presentaron una recuperación conductual en todos los parámetros evaluados. Esto nos señala que de alguna manera las células trasplantadas están promoviendo que la conducta de hiperactividad asociada a la lesión disminuya significativamente. Se podría suponer que esto es debido a que las células trasplantadas fueran capaces de sintetizar dopamina y que de alguna manera la dopamina llegó a la zona donde es requerida, como es el caso del estriado. Sin embargo para hacer tales aseveraciones se requieren estudios más detallados en los cuales se logre medir si se presenta una liberación de dopamina por parte de las células trasplantadas, el lugar exacto en donde se pudiera dar esta liberación en caso de que la hubiera y evaluar si la integración de las células es adecuadas en términos de viabilidad y funcionalidad a largo plazo.

La recuperación conductual se puede atribuir a las células trasplantadas y no a algún mecanismo compensatorio propio del cerebro. Si bien se ha reportado que en el caso de una lesión del sistema dopaminérgico en cerebros de ratas neonatas se presentan mecanismos compensatorios como es el caso de la inervación serotoninérgica, este estudio demuestra que las células positivas a TH trasplantadas son las que de alguna manera están promoviendo una disminución de la hiperactividad, ya que en todos los parámetros medidos, los animales sham que no recibieron células presentaron una conducta muy similar a los animales lesionados, mientras que la conducta de los animales trasplantados fue parecida a la de los animales control, es decir las células promovieron que se recuperara casi en su totalidad la conducta asociada a la lesión.

Sería interesante en estudios posteriores seguir el curso de las células con la finalidad de evaluar si la conducta de los animales trasplantados se mantiene, mejora o en su defecto disminuye y solo se tratase de una recuperación conductual. Asociado a esto se podría observar si las células migran a otras regiones, se integran, mueren o qué porcentaje de ellas sobrevive, así como si proyectan axones y si fuera el caso a que regiones inervan. Con base a los antecedentes se podrían medir estos parámetros cada mes posterior al trasplante, hasta los seis u ocho meses. Si se encontrara que la recuperación se mantiene se podría pensar en la búsqueda de los elementos del ambiente del cerebro neonato que podrían estar promoviendo la recuperación conductual y tratarlos de aplicar de alguna manera en trasplantes en animales adultos con la finalidad de intentar mejorar la terapia de reemplazo celular en un cerebro adulto.

La implicación de nuestro estudio en lo que respecta a la EP correspondería al hecho de que mientras más información se tenga en lo que concierne al estudio de la terapia de reemplazo celular en modelos de animales de la EP mejor se comprenderán los procesos necesarios para que

dicha alternativa terapéutica pudiera llevarse algún día a la clínica. Trabajos como el nuestro ofrecen una mayor información en lo que se refiere a un modelo poco estudiado como es lo es el modelo neonato. El estudio de éste podría brindarnos información relevante debido al hecho de que se trata de un ambiente completamente distinto al de un cerebro adulto. La investigación al respecto ampliaría nuestra visión sobre los estudios de terapias de reemplazo celular en modelos animales de la EP ya que la mayoría de ellos se realizan con animales adultos.

CONCLUSIONES

Se diferenciaron células troncales embrionarias a células que expresaran TH por medio del protocolo de cinco pasos desarrollado por Lee y colaboradores en el 2000.

Se lesionó la vía nigroestriatal en ratas neonatas con la neurotoxina 6-OHDA y se observó una disminución en la inmunoreactividad de TH de las NDA de la SN y en el estriado, además de que los animales lesionados presentaban las deficiencias motoras características de este modelo, asociadas a un incremento en la actividad espontánea.

Algunas células trasplantadas en los animales lesionados permanecieron en la SN, mientras que otras migraron del sitio de inyección y se alojaron en zonas como el estriado, corteza y fascículo medial.

Los animales trasplantados presentaron recuperación conductual estadísticamente significativa en todos los parámetros evaluados de la actividad espontánea evaluados.

El presente trabajo sugiere que el ambiente de un cerebro neonato favorece que el trasplante de células TH positivas en la SN promueva la recuperación conductual en animales neonatos lesionados de la vía nigroestriatal. Si bien la EP se presenta en personas de edad avanzada que poseen un cerebro maduro que no presentan las mismas características de un cerebro joven, la perspectiva del presente estudio sería que se continuaran los estudios en este modelo neonato con la finalidad de discernir los elementos que están promoviendo que las células trasplantadas favorezcan un proceso de recuperación conductual. Una vez identificados estos elementos podrían ser aplicados para promover una mayor integración celular en trasplantes en cerebros adultos y con ello en un futuro hacer más eficiente la terapia de reemplazo celular en pacientes con EP.

APÉNDICE

Se presentan las imágenes de la tinción correspondiente al anticuerpo M2 (que detecta células de origen murino, por lo que corresponde a las células trasplantadas) y la imagen de empalme correspondientes a las inmunotinciones presentadas en el texto.

Figura 4

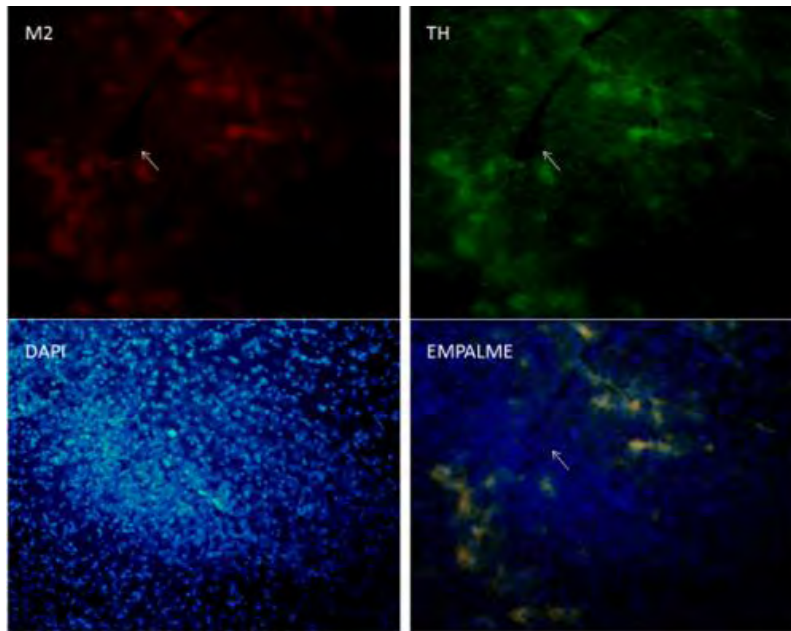


Figura 5

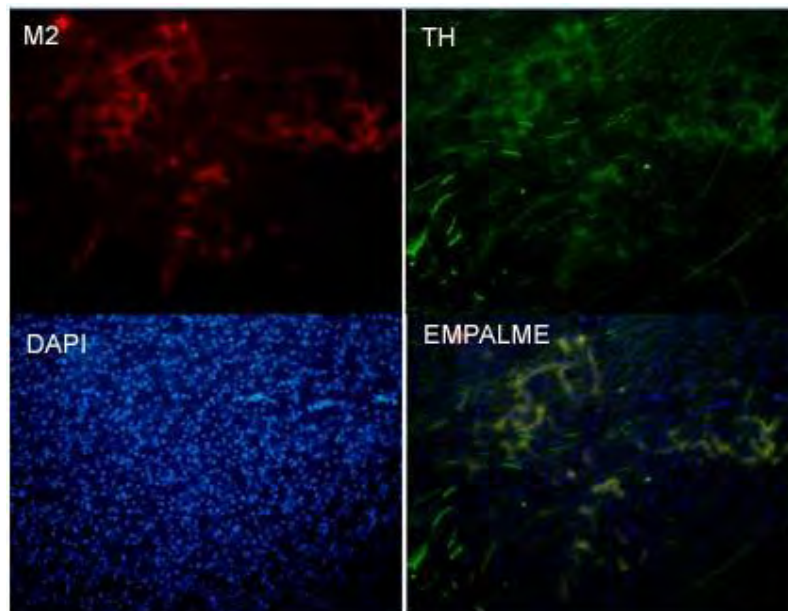


Figura 6

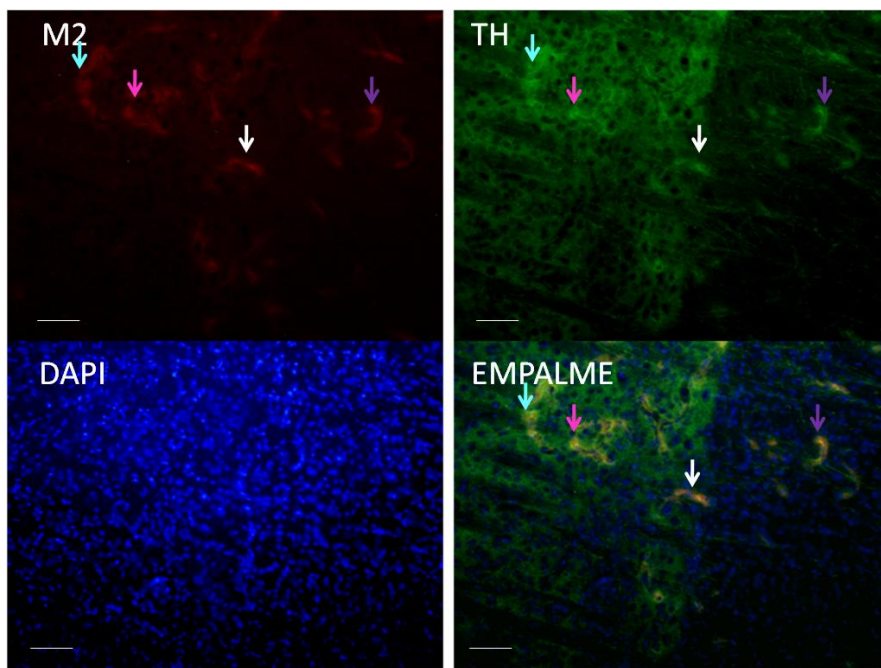


Figura 7a

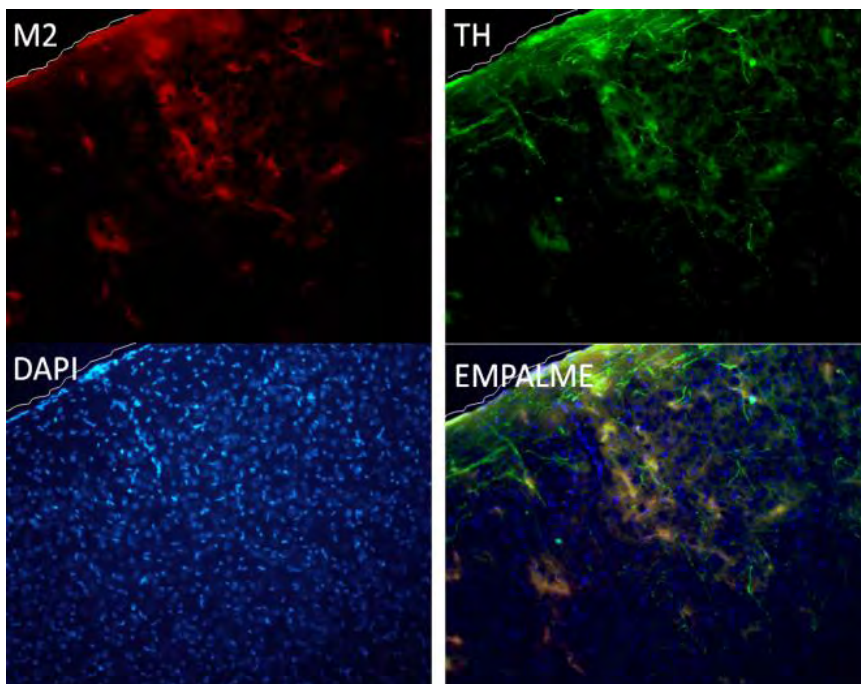
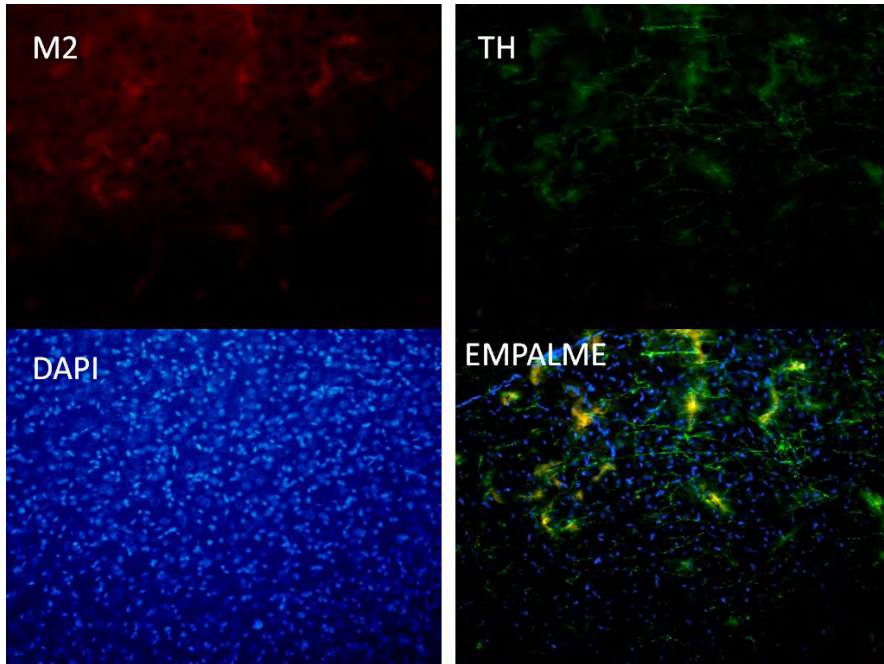


Figura 7b



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdala Sepúlveda Patricio Bertrand. La sustantia negra y el núcleo mesencefálico profundo como centro de salida de la información de los ganglios basales: evidencias electrofisiológicas. La laguna. 1998. Presentada en la Universidad de la Laguna para obtener el grado de Doctor.

Abrous D.N., Choulli K., Rouge-Pont F., Simon H., Moal L.M., Herman J.P. (1993)(1). Effects of Intracerebral Dopaminergic Grafts on Behavioural Deficits Induced by Neonatal 6-Hydroxydopamine lesions of the Mesotelencephalic Dopaminergic Pathway. *Neuroscience*. 54, 499-511

Abrous D.N., Torres E.M., Dunnett S.B., (1993)(2). Dopaminergic Grafts Implanted Into the Neonatal or Adult Striatum: Comparative Effects of Rotation and Paw Reaching Deficits Induced by Subsequent Unilateral Nigrostriatal Lesions in Adulthood. *Neuroscience*. 54, 657-668

Abrous D.N., Wareham A.T., Torres E.M., Dunnett S. B. (1992). Unilateral dopamine lesions in neonatal, weanling and adult rats: comparison of rotation and reaching deficits. *Behavioural Brain Research*. 51, 67-75

Antonopoulos J., Dori I., Dinopoulos A., Chiotelli M., Parnavelas J. G. (2002). Postnatal Development of the Dopaminergic System of the Striatum in the rat. *Neuroscience*. 110, 245-256

Arenas E. (2010). Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396, 152-156

Arenas E. (2002). Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*. 6, 795-808

Avale M.E., Nemirovsky S.I., Raisman-Vozari R., Rubinstein M. (2004). Elevated Serotonin Is Involved in Hyperactivity but not in the Paradoxical Effect of Amphetamine in Mice Neonatally Lesioned with 6-Hydroxydopamine. *Journal of Neuroscience Research*. 78, 289-296

Barzilai A., Melamed E. (2003). Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*. 9, 126-132

Beal M. F. (2001). Experimental Models of Parkinson's Disease. *Neuroscience Nature Reviews*. 2, 325-332

Bishop C., Tessmer J. L., Ullrich T., Rice K. C., Walker P.D. (2004). Serotonin 5-HT_{2A} Receptors Underlie Increased Motor Behaviors Induced in Dopamine-Depleted Rats by Intrastriatal 5-HT_{2A/2C} Agonism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 2, 687-694

Bjarkam C. R., Sørensen J. C., Sundae N. A., Geneser F. A., Østergaard K. (2001). New strategies for the treatment of Parkinson's disease hold considerable promise for the future management of neurodegenerative disorders. *Biogerontology*. 2, 193-207

Blum D., Torch S., Lambeng N., Marie-France N., Alim-Louis B., Sadoul R., Jean-Marc V. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 65, 135-172

Breese G. R., Knapp D. J., Criswell H. E., Moy S. S., Papadeas S. T., Blake B. L. (2005). The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Research Reviews*. 48, 57-73

Bruce A. P., Murtha S. J. E., Park G. A. S., Condon K. T., Szirtes R. M., Laventure S. I., Ally A. (1992). Neonatal Brain Dopamine Depletion and the Cortical and Behavioral Consequences of Enriched Postweaning Environment. 42, 741-748

Butz M., Wörgötter F., Ooyen A.V. (2009). Activity-dependent structural plasticity. *Brain Research*. 60, 287-305

Carder R.K. and Snyder-Keller A.M., (1987). Amphetamine- and stress-induced turning after nigral transplants in neonatally dopamine-depleted rats. *Developmental Brain Research*. 33, 315-318

Castañeda E., Whishaw I.Q., Lerner L., Robinson T.E. (1990). Dopamine depletion in neonatal rats: effects on behavior and striatal dopamine release assessed by intracerebral microdialysis during adulthood. *Brain Research*. 508, 30-39

Centonze D., Calabresi P., Giacomini P., Bernardi G. (1999). Neurophysiology of Parkinson's disease: from basic research to clinical correlates. *Clinical Neurophysiology*. 110, 2006-2013

Chapman S.B. and Mckinnon L. (2000). Discussion of Developmental Plasticity: Factors Affecting Cognitive Outcome After Pediatric Traumatic Brain Injury. *J. Commun. Disord*. 33, 333-344

Chung S., Leung A., Baek-Soo H., Mi-Yoon, Jung-II M., Chun-Hyung K., Hong S., Pruzak J., Isacson O., Kwang-Soo K. (2009). Wnt1-lmx1a Forms a Novel Autoregulatory Loop and Controls Midbrain Dopaminergic Differentiation Synergistically with the SHH-FoxA2 Pathway. *Cell Stem Cell*. 5, 646-658

Concannon J.T. and Schechter M.D. (1979). Hyperactivity in Developing Rats: Sex Differences in 6-Hydroxydopamine and Amphetamine Effects. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 14, 5-10

Cunningham M. G., Connor C.M., Zhang K., Benes F.M. (2005). Diminished serotonergic innervation of adult medial prefrontal cortex after 6-OHDA lesions in the newborn rat. 157, 124-131

Daur W., Przedborski S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. 39, 889-909

Dauids E., Zhang K., Kula N.S., Tarazi F.I., Baldessarini. (2002). Effects of Norepinephrine and Serotonin Transporter Inhibitors on Hyperactivity Induced by Neonatal 6-Hydroxydopamine Lesioning in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 3, 1097-1102

Dennis M. (2010). Margaret Kennard (1899–1975): Not a ‘Principle’ of brain plasticity but a founding mother of developmental neuropsychology. *Cortex*. 46, 1043-1059

Descarries L., Jean-Jacques S., Garcia S., Doucet G., Bruno J.P. (1992). Ultrastructural analysis of the serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum following neonatal dopamine denervation with 6-hydroxydopamine. 569, 1-13

Donovan P. J. and Gearhart J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 414, 92-97

Erinoff L. and Snodgrass S.R. (1986). Effects of Adult or Neonatal Treatment With 6-Hydroxydopamine or 5,7-Dihydroxytryptamine on Locomotor Activity, Monoamine Levels, and Response to Caffeine. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 24, 1039-1045

Fernandes X.F.G., Doucet G., Geffard M., Descarries L. (1994). Dopamine Neoinnervation in the Substantia Nigra and Hyperinnervation in the Interpeduncular Nucleus of Adult Rat Following Neonatal Cerebroventricular Administration of 6-Hydroxydopamine. *Neuroscience*. 59, 1, 77-87

Fortier L. A. (2005). Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*. 34, 415–423

Gilbert S. F. 2003. Séptima Edición en inglés. *Developmental Biology*. Editorial Panamericana. 373 p. ISBN 0-87893-258-5

Gage F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*. 287, 1433-1438

Goya R. L., Typers P., Barker R. A. (2008). The search for a curative cell therapy in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 265, 32-42

Graybiel A. N. (1996). Basal Ganglia: New therapeutic approaches to Parkinson's disease. 4, 368-371

Guridi J., Rodríguez-Oroz M.C., Manrique M. (2004). Tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Parkinson. *Neurocirugía*. 15, 5-16

Herman J.P., (1991). Anatomical and behavioral comparison of unilateral dopamine-rich grafts implanted into the striatum of neonatal and adult rats. 2, 465-475

Jankovic J., Chen S., Le W.D. (2005). The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 77, 128–138

Joel D., Weiner I. (2000). The Connections of the Dopaminergic System with the Striatum in Rats and Primates: an Analysis with Respect to the Functional and Compartmental Organization of the Striatum. *Neuroscience*. 96, 451-474

Joyce J.N., Frohna P.A., Neal-Beliveau B.S. 1996. Functional and Molecular Differentiation of the Dopamine System Induced by Neonatal Denervation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 3, 453-486.

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

Kondo T. (2002). Initial therapy for Parkinson's disease: levodopa vs dopamine receptor agonists. *J Neurol*. 249, Suppl 2, 25-29

Li J., Dani J. A., Le W. (2009). The Role of Transcription Factor Pitx3 in Dopamine Neuron Development and Parkinson's Disease. *Curr Top Med Chem*. 10, 855-859

Lin J., Rosenthal A. (2003). Molecular mechanisms controlling the development of dopaminergic neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 14, 175-180

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

Luthman J., Lindqvist E., Ogren S. O. (1993). Hyperactivity in Neonatally Dopamine-Lesioned Rats Requires Residual Activity in Mesolimbic Dopamine Neurons. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1, 159-163

McDonald W. M., Richard I. H., DeLong M. R. (2003). Prevalence, Etiology, and Treatment of Depression in Parkinson's Disease. *Biol Psychiatry*. 3, 363-375

Manning L. (2008). Do some neurological conditions induce brain plasticity processes?. *Behavioural Brain Research*. 192, 143-148

Masuo Y., Ishido M., Morita M., Oka S. (2004). Effects of Neonatal Treatment with 6-Hydroxydopamine and Endocrine Disruptors on Motor Activity and Gene Expression in Rats. *Neural Plasticity*. 11, 59-76

Mendez I., Viñuela A., Astradsson A. Mukhida K., Hallett P., Robertson H., Tierney T., Holness R. Dagher A., Trojanowsky J. Q., Isacson O. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature Medicine*. 14, 507-509

Merello M. (1999). Anatomía Funcional de los Ganglios Basales. *Archivos de Neurología, Neurocirugía y Neuropsiquiatría*. 3, 11-18

Nakatani T., Kumai M., Mizuhara E., Minaki Y., Ono Y. (2010). Lmx1a and Lmx1b cooperate with Foxa2 to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Developmental Biology*. 339, 101-113

- Nikkhah G., Cunningham M. G., Cenci M. A., Mckey R. D., Bjorkund A. 1995. Dopaminergic Microtransplants into the Substantia Nigra of Neonatal Rats with Bilateral 6-OHDA Lesions. I. Evidence for Anatomical Reconstruction of the Nigrostriatal Pathway. *The Journal of Neuroscience*. 5, 3548-3561
- Nunes I., Tovmasian L. T., Silva R. M., Burke R. E., Goff S. P. (2003). Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS*. 7, 4245-4250
- Olanow C. W. (2008). Levodopa/Dopamine Replacement Strategies in Parkinson's Disease—Future Directions. *Movement Disorders*. 3, 613-222
- Olanow y Kordower J. H. (2009a). Modeling Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*. 4, 432-436
- Olanow C. W., Kordower J. H., Lang A. E., Obeso J. A. (2009b). Dopaminergic Transplantation for Parkinson's Disease: Current Status and Future Prospects. *Ann Neurol*. 66, 591-596
- Ortega C. A. J. (1993). Enfermedad de Parkinson y Transplante Neural. *Elementos*. 19, 17-20
- Perez M. M. I. and Lorenti A. (2006). Células Troncales (Stem Cells) y Regeneración Cardíaca. *Medicina (Buenos Aires)*. 66, 574-582
- Priyadarshi A., Khuder S. A., Schaub E. A., Priyadarshi S. S. (2001). Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Metaanalysis. *Environmental Research Section A*. 88, 122-127
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A. S., McNaamara J.O., Williams S. M., Neurociencia. Editorial Panamericana. Tercera Edición. España. 2007. ISBN 978-84-7903-989-9. p856
- Quintero R. L. N. (2003). Síndrome de Parkinson. *Revista Facultad de Medicina*. 51, 203-215
- Radja F., Descarries L., Dewar K. M., Reader T. A. (1993). Serotonin 5-HT 1 and 5-HT 2 receptors in adult rat brain after neonatal destruction of nigrostriatal dopamine neurons: a quantitative autoradiographic study. *Brain Research*. 606, 273-285
- Rezak M. (2007). Current Pharmacotherapeutic Treatment Options in Parkinson's Disease. *Dis Mon*. 53, 214-222
- Riddle R. y Pollock J. D. (2003). Making connections: the development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Developmental Brain Research*. 147, 3 – 21
- Rilling L. M., Lucas J. A., Uitti R. J. (2005). Postsurgical Behavioral Changes. *Current Clinical Neurology*. 75, 75-92
- Rodríguez D. M., Abdala P., Barroso-Chinea P., Obeso J., González-Hernández T. (2001). Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*. 122, 79-92

Rodríguez-Gómez J. A., Jiang-Qiang L., Velasco I., Rivera S., Zoghbi S. S., Jieh-San L., Musachio J. L., Chin F. T., Toyama H., Seidel J., Green M. V., Thanos P. K., Ichise M., Pike V. W., Innis R. B., McKay R. D. G. (2007). Persistent Dopamine Functions of Neurons Derived from Embryonic Stem Cells in a Rodent Model of Parkinson Disease. *Stem Cells*. 25, 918-928

Sable V., Sailaja K., Gopinath G., Tandon P.N. (1997). Fetal Dopaminergic Neurons Transplanted to the Normal Striatum of Neonatal or Adult Rats and to the Denervated Striatum of Adult Rats. *Freund Publishing House Ltd*. 2, 73-81

Schwarz S. C. and Schwarz J. (2010). Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Translational Research*. 3, 155-160

Secretaría de Salud. (2006). Programa Específico de Enfermedad de Parkinson. Primera Edición. México.

Shao-pii O., Balzer J.R., Sidney J. P., Stricker M. E., Zigmond M. J., Berger T. W. (1990). Lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in neonatal rats: effects on the electrophysiological activity of striatal neurons recorded during adulthood. *Brain Research*. 518, 274-278

Sherer T. B., Betarbet R., Greenamyre J. T., (2002). Environment, Mitochondria, and Parkinson's Disease. *Neuroscience update*. 8, 192-197

Simola N., Morelli M., Carta A. R. (2007). The 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*. 11, 151-167

Smidt M. P., Smits S. M., Burbach P. H. (2003). Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *European Journal of Pharmacology*. 480, 75– 88

Smidt M. P., Smits S. M., Burbach P. H. (2004). Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res*. 318, 35–43

Taylor H. and Minger S. L. (2005). Regenerative medicine in Parkinson's disease: generation of mesencephalic dopaminergic cells from embryonic stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*. 16, 487-492

Wang Y., Chen S., Yang D., Wei-dong L. (2007). Stem Cell Transplantation: A Promising Therapy for Parkinson's Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2, 243-250

Weihmuller F.B. and Bruno J.P. (1989). Age-dependent plasticity in the dopaminergic control of sensorimotor development. *Behavioural Brain Research*. 35, 95-109

Wichterle H. and Przedborski S. (2010). What can pluripotent stem cells teach us about neurodegenerative diseases?. *Nature Neuroscience*. 13, 800-804