



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EL POTENCIAL DE LAS CROMOESFERAS COMO TERAPIA DE REEMPLAZO  
CELULAR EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALEJANDRA BORONAT GARCIA

Director de tesis:

Dr. René Drucker Colín

Depto. de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.

Miembros del comité tutor:

Dr. Arturo Hernández Cruz

Depto. de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.

Dr. José Segovia Vila

Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV.



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.

“Arguments from authority carry little weight – authorities have made mistakes in the past. They will do so again in the future. Perhaps a better way to say it is that in science there are no authorities; at most, there are experts”

(Carl Sagan, *The Demon-Haunted World: Science as a Candle in the Dark*)

A mi familia.

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

No tengo palabras que puedan expresar lo que siento y agradezco a todas las personas que formaron parte de este proceso. Siendo la última parte en ser escrita, esta sección de la tesis representa lo que implica la construcción de un proyecto donde no solo lo académico, lo teórico y lo técnico forman parte del quehacer científico. Todo esto junto con el aprendizaje y crecimiento personal derivado de las experiencias vividas, los fracasos y los diálogos constructivos son lo que finalmente me permitieron concluir esta etapa y comenzar un nuevo capítulo.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de continuar mi formación académica y personal dentro de sus enriquecedoras aulas, laboratorios y pasillos. Mi segundo hogar. Al Instituto de Fisiología Celular por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de desarrollar el proyecto dentro de sus instalaciones.

A mi tutor el Dr. René Drucker Colín que durante los últimos nueve años me ha permitido permanecer en su laboratorio para aprender y construirme profesionalmente. A mi comité tutorial, el Dr. Arturo Hernández Cruz y al Dr. José Segovia Vila por estar al pendiente, ser críticos durante este proceso y formar parte de esta etapa tan significativa.

A la Dra. Magdalena Guerra Crespo por su apoyo, su tiempo e interés en contribuir al desarrollo de este proyecto. Por escucharme y ser parte de las decisiones que he tomado en los momentos más difíciles. También agradezco y dedico esta tesis a Marcela Palomero Rivero por estar siempre presente y al pendiente durante los últimos 9 años, encontrando en ella una gran amiga y colaboradora. A Diana Alicia Millán Aldaco por su ayuda con los experimentos realizados en el trabajo.

Agradezco a la Dra. Claudia Rivera y Héctor Malagón de la Unidad de Bioterio y Vivario del Instituto por proveer los animales para la realización de mis experimentos. También a Francisco Eugenio Pérez y Ana María Escalante, del equipo de cómputo del Instituto, por brindar soporte técnico durante la realización del proyecto.

Agradezco y dedico esta tesis a mi familia. Especialmente a mis padres y hermano por ser parte de mi vida, por tolerarme y seguir impulsándome, por su apoyo incondicional, por alentar el crecimiento académico, por permitirme tener la mejor educación a pesar de todos los esfuerzos que requería. A mis abuelos, tíos y primos por creer en mí y compartir las alegrías de la familia. Gracias por estar ahí. A todos mis compañeros y colegas del laboratorio, pasados y presentes, que además de contribuir con sus críticas activas hicieron todo el proceso mas divertido. A mis amigos de la Facultad y del Colegio por compartir grandes momentos que nos marcan como personas, por seguir construyendo y compartiendo nuestros caminos. A mis amigas, mis hermanas que tantos años han estado a mi lado y que día a día seguimos compartiendo las enseñanzas de la vida. Por siempre hacerme ver la parte positiva de las cosas, por todos los momentos de reflexión, tristeza y risas que hemos vivido. A Andrés, que prácticamente vivió conmigo todo el proceso de este trabajo. Por escucharme en los momentos más difíciles y ser parte de la fuerza que me mantuvo a flote. Por ser parte de mi vida sin importar lo difícil que puede llegar a ser.

La tesis se desarrolló gracias a los fondos otorgados por ICyTDF/170/2012-SECITI/014/2013 (Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal).

<b>AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA .....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<i>Enfermedad de Parkinson (EP).....</i>	<i>10</i>
<i>Síntomas motores: correlatos anatómicos y fisiológicos.....</i>	<i>11</i>
<i>Modelos animales de la EP.....</i>	<i>16</i>
<i>Estudio de las alteraciones motoras en el modelo de 6-OHDA de la EP.....</i>	<i>18</i>
<i>Tratamientos de la EP.....</i>	<i>21</i>
<i>Terapia de reemplazo celular en la EP.....</i>	<i>22</i>
<i>Células de tipo progenitor de células cromafines: Cromoesferas.....</i>	<i>26</i>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<i>El cultivo de cromoesferas favorece el fenotipo dopaminérgico .....</i>	<i>44</i>
<i>El trasplante de cromoesferas y sus efectos sobre la conducta motora en el modelo de 6-OHDA de la EP.....</i>	<i>48</i>
<i>Sobrevivencia del trasplante de cromoesferas en el modelo de 6-OHDA de la EP ....</i>	<i>59</i>
<i>Relación entre la supervivencia de las cromoesferas y la disminución en la conducta de giro .....</i>	<i>64</i>
<i>Comparación del trasplante de cromoesferas y el trasplante de CC en el modelo de 6-OHDA de la EP .....</i>	<i>67</i>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<i>Sobre la supervivencia .....</i>	<i>71</i>
<i>Sobre la funcionalidad .....</i>	<i>75</i>
<i>Sobre su aplicación a la clínica .....</i>	<i>80</i>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-Hidroxydopamina

CC: Células cromafines

DBH: Dopamina  $\beta$ -hidroxilasa

EP: Enfermedad de Parkinson

Células FVM: células fetales del mesencéfalo ventral

GPe: Globo pálido externo

GPi: Globo pálido interno

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NEM: Neuronas espinosas medianas

SNpc: Sustancia nigra pars compacta

SNpr: Sustancia nigra pars reticulata

TH: Tirosina hidroxilasa

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por un conjunto de síntomas no motores y motores que progresan secuencialmente. Los síntomas motores se atribuyen a la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta*. La pérdida de estas neuronas disminuye la liberación de dopamina dentro de su estructura blanco, es decir, el cuerpo estriado. La terapia de reemplazo celular busca reestablecer la neurotransmisión dopaminérgica mediante el trasplante de células dopaminérgicas dentro de la sustancia *nigra pars compacta* o dentro del cuerpo estriado. Actualmente, los tipos celulares más prometedores utilizados son células derivadas del mesencéfalo ventral fetal, células troncales embrionarias así como pluripotentes inducidas. El uso de estas fuentes ha sido limitado por cuestiones técnicas y éticas asociadas al uso de tejido fetal y por razones de seguridad asociadas a la formación de tumores. Por otro lado, recientemente se desarrolló un cultivo celular para el aislamiento y expansión de células de tipo progenitor de células cromafines de la médula adrenal de bovino y humano adultos. En condiciones de baja adherencia, estas células se agregan formando estructuras esféricas (*i.e.* cromoesferas) donde cierto porcentaje se diferencia a un fenotipo neuronal dopaminérgico. Dadas las características de las cromoesferas, estas representan una fuente celular prometedora para la terapia de reemplazo celular en la EP. En el presente trabajo determinamos que el cultivo de cromoesferas favorece el fenotipo dopaminérgico y la liberación de dopamina en comparación a células cromafines. Además, encontramos que el trasplante de cromoesferas en el modelo de 6-OHDA de la EP puede sobrevivir y disminuir las alteraciones motoras. Finalmente, al compararlas directamente con el trasplante de células cromafines, el trasplante de cromoesferas mostró mayores efectos funcionales y mayor sobrevivencia.



## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a complex disease characterized by non-motor and motor symptoms that develop in a sequential manner. The motor symptoms derived from the selective loss of dopaminergic neurons from the substantia *nigra pars compacta*, which leads to a decrement in dopamine released into the striatum. Cell replacement therapy aims at reestablishing dopamine neurotransmission by grafting dopaminergic cells directly into the striatum, the site where dopamine is needed. Currently, fetal ventral-mesencephalic cells and embryonic and induced-pluripotent stem cells are the most promissory sources. These cells have shown to decrease motor alterations observed in animal models of PD. However, related technical and ethical issues such as the use of fetal tissue together with safety issues related to tumor development have limited the use of these cell types. On the other hand, recently it was developed a cell culture protocol to isolate and to expand chromaffin progenitor-like cells derived from adult bovine and human adrenal medullae. Under low attachment conditions, these cells grow as spheres which are known as chromospheres in which some percentage of chromosphere-derived cells acquired a dopaminergic phenotype. Thus, due to chromospheres characteristics they represent a good candidate for cell replacement therapy in PD. In the present work we found that chromosphere cell culture increases the dopaminergic phenotype together with dopamine release when compared to chromaffin cells. In addition, we found that chromosphere grafted in the 6-OHDA animal model of PD can survive in some animals for at least 3 months after grafting. Also, in chromosphere surviving grafted animals the motor alterations evaluated with three behavioral tests were reduced. Finally, when compared directly to chromaffin cell grafts, chromospheres shown higher functional outcome and higher survival.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por síntomas no motores y motores. Éstos últimos son el principal blanco terapéutico pues son los más incapacitantes para el paciente. La alteración fisiológica asociada a los síntomas motores es la pérdida de la neurotransmisión dopaminérgica en el circuito de los ganglios basales, estructura asociada a la coordinación y al control de movimientos voluntarios. El tratamiento más utilizado para aliviar los síntomas motores es la administración de levodopa, sin embargo conforme la enfermedad progresa se vuelve insuficiente y conlleva a la aparición de efectos secundarios severos asociados a la administración no regulada fisiológicamente del neurotransmisor. Consecuentemente, existe la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas centradas en una administración focal y más fisiológica de dopamina. En este sentido, en la década de los ochenta fue propuesta como alternativa terapéutica la terapia de reemplazo celular. El principio fundamental es proveer de una fuente exógena de dopamina mediante el trasplante de células, capaces de sintetizar y liberar dopamina, directamente en el sitio deseado con el fin de reestablecer la neurotransmisión dopaminérgica. Esta opción terapéutica difiere de la farmacéutica en que se espera que las células trasplantadas se integren funcionalmente en el circuito y liberen las moléculas de manera regulada en respuesta a necesidades fisiológicas. Sin embargo, después de casi 40 años de investigación se sigue persiguiendo ese objetivo para su correcta aplicación a la clínica.

Las células cromafines (CC) derivadas de la médula adrenal de tejido adulto fueron una de las primeras fuentes celulares en ser utilizadas en el contexto de la EP dada su capacidad de liberar catecolaminas y su fácil obtención. Sin embargo, el trasplante de CC

ha mostrado resultados variables e impredecibles en modelos animales de la EP y en pacientes con EP, principalmente por su baja sobrevivencia. Dos fuentes alternativas prometedoras son células fetales del mesencéfalo ventral (FVM) y neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias y pluripotentes inducidas. El trasplante de estas fuentes celulares sobrevive más y tiene mayores efectos funcionales durante tiempos prolongados, en comparación a las CC. Sin embargo, el uso de estas células involucra otros problemas importantes, incluyendo cuestiones éticas y técnicas (relacionadas al uso de fuentes celulares derivadas de tejido fetal) así como el potencial tumorigénico (relacionado al uso de células pluripotentes). Estas cuestiones han limitado su aplicación.

Por otro lado, con el fin de aislar células de tipo progenitor a partir de la médula adrenal de tejido adulto, Ehrhart-Bornstein y colaboradores desarrollaron un protocolo de aislamiento y cultivo que permite la expansión de células de tipo progenitor de CC derivadas de la médula adrenal de bovino y humano adultos. En condiciones de cultivo de baja adherencia, estas células se agregan y crecen como esferas, llamadas cromoesferas en analogía a las neuroesferas. Una proporción significativamente mayor de células derivadas de las cromoesferas adquieren un fenotipo dopaminérgico en comparación a CC. En el presente trabajo se corrobora esta observación, demostrando que el cultivo de cromoesferas derivadas de bovino adulto incrementa el fenotipo dopaminérgico y la liberación de dopamina basal en comparación a CC. Las propiedades *in vitro* de las cromoesferas observadas por otros y en el presente trabajo, ofrecen una fuente celular alternativa para la terapia de reemplazo celular en la EP que no había sido probada hasta ahora. En el presente estudio, demostramos que el trasplante de cromoesferas en el estriado de animales

lesionados con 6-OHDA puede sobrevivir en cierto porcentaje de animales trasplantados (57%) hasta por tres meses. En animales con trasplante sobreviviente, las alteraciones motoras presentes en el modelo animal de la EP disminuyen, evaluadas mediante pruebas farmacológicas y no farmacológicas. Determinamos también que la sobrevivencia de las células es necesaria pero no es el único factor involucrado para inducir un efecto funcional. El presente trabajo destaca el hecho de que el trasplante de cromoesferas sobrevive sólo en algunos animales y que la mejora motora no se da en todos los animales con igual número de células sobrevivientes trasplantadas. Estas observaciones son consistentes con reportes experimentales realizados en los ochenta empleando distintas fuentes celulares (incluyendo células FVM y CC). Esto sugiere que hay factores importantes de las células trasplantadas y del hospedero, así como la interacción entre ambos, que son clave para predecir un resultado positivo y consistente. Esto último es fundamental para que esta terapia sea una opción clínica.

Finalmente, en el presente trabajo se encontró que el trasplante de cromoesferas constituye una mejor fuente celular, en términos de sobrevivencia y efectos funcionales, que las CC. Diversos aspectos relacionados con el mecanismo asociado a la funcionalidad del trasplante de cromoesferas no fueron estudiados, pero la evidencia indirecta derivada de las pruebas conductuales y los experimentos *in vitro* sugieren que mecanismos asociados a la dopamina pueden tener un papel importante.

## Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia que afecta del 1 al 3% de la población mundial (Dorsey *et al.*, 2007). Se compone de un conjunto de síntomas no motores y motores que, de acuerdo con Braak y colaboradores, se manifiestan de manera secuencial y predecible en distintas etapas (Braak *et al.*, 2004). La primera es la etapa pre-motora donde se presentan síntomas como pérdida del olfato (*e.g.* hiposmia) y problemas gastrointestinales (*e.g.* constipación). Esta etapa ha sido blanco de investigación con el fin de utilizarla para un diagnóstico temprano (Haehner *et al.*, 2009). Sin embargo, resulta complicado dado que los síntomas no cumplen con los requisitos aceptados en el criterio de diagnóstico, pudiendo pasar hasta 20 años para un diagnóstico positivo. Posteriormente, en la etapa motora aparecen alteraciones del sueño (*e.g.* alteraciones en la fase de movimientos oculares rápidos) junto con los síntomas motores clásicos que incluyen temblor distal en reposo, rigidez muscular, enlentecimiento de los movimientos voluntarios y pérdida de los reflejos posturales. En etapas tardías, el proceso neurodegenerativo se expande y aparecen síntomas asociados a cortezas de asociación y sensoriales como alucinaciones, demencia y episodios de confusión (Braak *et al.*, 2004). Se estima que 15 años después del diagnóstico de la enfermedad, el 70% de los pacientes morirán (Tolosa *et al.*, 2015).

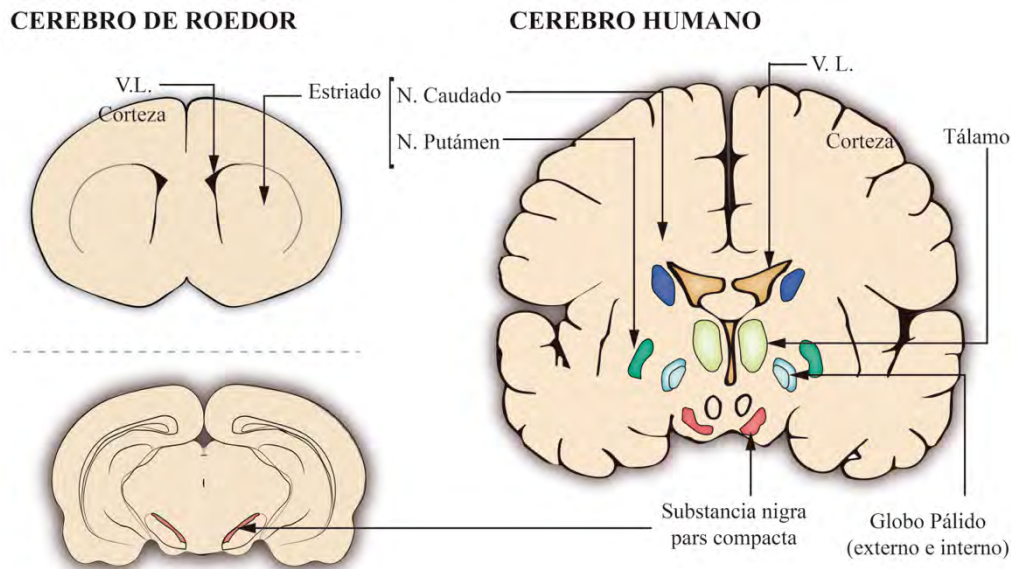
La patología de la enfermedad no se conoce del todo. Sin embargo se ha asociado a la aparición de inclusiones filamentosas de proteínas agregadas en el citosol de ciertas células (*i.e.* cuerpos de Lewy), así como neuritas aberrantes alargadas (*i.e.* neuritas de Lewy). El componente principal de éstos agregados es la proteína  $\alpha$ -sinucleína (Spillantini *et al.*, 1997), cuya estructura terciaria alterada fomenta su agregación con otras  $\alpha$ -

sinucleínas y otras proteínas (Fujiwara *et al.*, 2002). Otro tipo de moléculas que también se pueden encontrar en estos agregados son proteínas mal-plegadas, truncadas y normales así como ubiquitina y enzimas asociadas (Xia *et al.*, 2008). Tanto los cuerpos como las neuritas de Lewy son el correlato histológico para el diagnóstico post-mortem de la enfermedad y ocurren solo en ciertas poblaciones neuronales y en regiones específicas del sistema nervioso (Braak *et al.*, 2002; Forno, 1996; Jellinger, 2003; Ohama and Ikuta, 1976). La degeneración predominante de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) es la responsable de los síntomas motores pero las causas de la mayor vulnerabilidad en ciertos tipos celulares aun se desconocen (para una revisión de este tema (Surmeier, 2007)).

### Síntomas motores: correlatos anatómicos y fisiológicos

Los síntomas motores de EP están asociados a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la subsecuente pérdida de dopamina liberada en las estructuras donde proyectan dichas neuronas (núcleo caudado y núcleo putámen) (Figura 1). Se manifiestan cuando la degeneración supera al 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Fearnley and Lees, 1991). Las estructuras antes mencionadas (SNpc y núcleos caudado y putámen), junto con el globo pálido y el núcleo subtalámico conforman lo que se conoce como ganglios basales cuya función principal es la coordinación y el control del movimiento voluntario (Alexander and Crutcher, 1990) (Figura 1). En animales no humanos, el conjunto de los núcleos caudado y putámen se le conoce como cuerpo estriado (Figura 1). Éste es la principal entrada de los ganglios basales, donde se integra información de distintas áreas incluyendo información cortical, información proveniente de

otros núcleos de los ganglios basales e información del tálamo (Alexander and Crutcher, 1990).



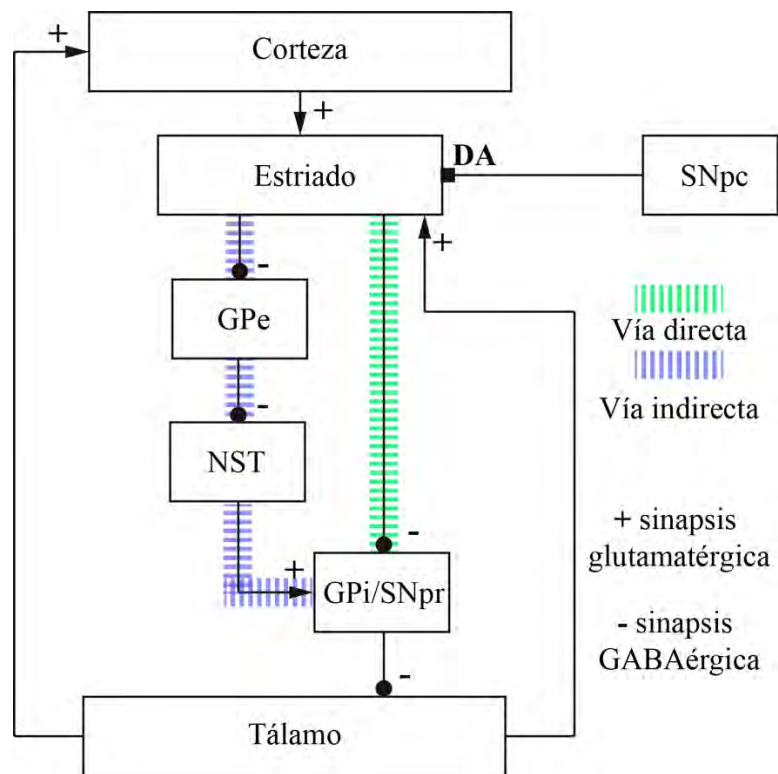
**Figura 1. Representación esquemática de algunos núcleos que integran los ganglios basales del cerebro de roedor y de humano.** Los ganglios basales se conforman de distintas estructuras incluyendo: el estriado (en roedor) o los núcleos caudado y putámen (en humano), la sustancia nigra pars compacta, el globo pálido (interno y externo) y el núcleo subtalámico (no señalado). Los esquemas de arriba son cortes coronales para mostrar la localización del estriado (en roedor) y los núcleos caudado (azul) y putámen (verde) junto con la sustancia nigra pars compacta (rojo), el tálamo (verde claro) y el globo pálido (azul claro). El esquema de abajo es una sección coronal a nivel de la sustancia nigra pars compacta (rojo) en el cerebro de roedor. L.V (ventrículos laterales). Tomado y modificado de Boronat-García *et al.*, 2017

El control y la coordinación del movimiento mediado por los ganglios basales es un proceso complejo. El modelo de organización anatómica y funcional relacionado fue propuesto por Albin y DeLong a finales de los años ochenta (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990). Actualmente, se han descrito mas conexiones que las propuestas en un inicio por Albin y DeLong (Smith and Wichmann, 2008), sin embargo el modelo inicial es simple y continúa siendo la base para entender la función de los ganglios basales así como las alteraciones asociadas a dicha estructura (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990). El modelo

propone que dentro del estriado existen dos vías de salida que controlan la conducta motora: la vía directa y la vía indirecta (Figura 2). Ambas vías están formadas por neuronas espinosas medianas (NEM) que utilizan GABA como principal neurotransmisor. Las NEM reciben entradas glutamatérgicas desde la corteza (que es el principal activador de dichas neuronas) y tálamo, así como dopaminérgicas desde la SNpc (Figura 2). Las dos vías se conocen como vía directa e indirecta dada la forma en en la que llegan a los núcleos de salida de los ganglios basales (globo pálido interno, GPi, y sustancia nigra pars reticulata, SNpr). Ambos núcleos de salida contienen neuronas GABAérgicas que se encuentran tónicamente activas, inhibiendo a sus estructuras blanco (*i.e.* circuito tálamo-corteza encargado de la ejecución del movimiento). Por un lado, la vía directa proyecta directamente a los núcleos de salida (GPi/SNpr) e inhibe la inhibición que dichas estructuras ejercían sobre el tálamo (Figura 2), favoreciendo la activación de las neuronas glutamatérgicas del tálamo y su efecto sobre los núcleos blanco (*e.g.* activación del circuito tálamo-corteza). De esta manera, la vía directa favorece el movimiento. Por otro lado, la vía indirecta pasa por dos estructuras de relevo antes de llegar a los núcleos de salida (Figura 2). El primer relevo se da en el globo pálido externo (GPe) que contiene neuronas GABAérgicas con actividad tónica e inhiben al núcleo subtalámico. Sin embargo, cuando las NEM de la vía indirecta se encuentran activas inhiben a las neuronas del GPe, y por lo tanto la inhibición que ejercían sobre el núcleo subtalámico. El núcleo subtalámico se conforma por neuronas glutamatérgicas (Figura 2), que proyectan directamente hacia los núcleos de salida (GPi/SNpr) y aumentan la actividad en estas estructuras (Figura 2). Esto último se traduce en que al estar más activos los núcleos de salida (GPi/SNpr), los núcleos blanco (*e.g.* circuito tálamo-cortical) se encontrarán inhibidos al igual que el movimiento (Figura 2), contrario a lo que sucede cuando la vía directa es activada. En resumen, el



modelo propone que el comportamiento asociado a los ganglios basales va a depender de los patrones de disparo de los núcleos de salida que se encuentran tónicamente activos en ausencia de activación de la vía directa. Como resultado, los núcleos blanco (circuito tálamo-cortical) estarán inhibidos. Cuando la vía directa es activada el movimiento será favorecido al inhibir la inhibición de los núcleos de salida, mientras que la activación de la vía indirecta atenuará o terminará el movimiento o suprimirá la secuencia de los movimientos no deseados (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990).



**Figura 2. Diagrama simplificado del macro-circuito de los ganglios basales.** El diagrama muestra el modelo inicial propuesto por Albin y DeLong que explica el funcionamiento de los ganglios basales sobre el control del movimiento. En el estriado existen dos vías de salida conformadas por neuronas espinosas medianas (NEM) GABAérgicas. Las sinapsis GABAérgicas (inhibitorias) están representadas con círculos, las glutamatergicas (excitatorias) con flechas y las dopaminérgicas con un cuadrado. Las NEM de la vía directa (señalada en color verde) proyectan a los núcleos de salida de los ganglios basales (globo pálido interno, GPi, y sustancia nigra pars reticulata, SNpr) inhibiendo a las neuronas GABAérgicas del GPi/SNpr. Por lo tanto, se inhibe la inhibición que las neuronas del GPi/SNpr ejercían sobre el tálamo y por ende las

neuronas glutamatérgicas del tálamo se activan, facilitando el movimiento. Las NEM de la vía indirecta (señalada en color morado) proyectan hacia el globo pálido externo (GPe) que contiene neuronas GABAérgicas. Esto hace que las neuronas del GPe se inhiban y por lo tanto dejen de inhibir a las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico (NST), las cuales proyectan hacia el GPi/SNpr incrementando así la activación de las neuronas GABAérgicas en los núcleos de salida. Finalmente, estas neuronas inhiben a las neuronas glutamatérgicas del tálamo, inhibiendo el movimiento. DA, sinapsis dopaminérgica.

Como se mencionó anteriormente, los síntomas motores de la EP son consecuencia de la disminución de dopamina en el estriado. La dopamina liberada por las neuronas dopaminérgicas provenientes de la SNpc modula la actividad de las NEM. Las NEM de la vía directa expresan receptores dopaminérgicos de tipo D1, mientras que las NEM de la vía indirecta expresan preferentemente receptores de tipo D2. La activación de estos receptores provoca respuestas distintas a nivel de excitabilidad puesto que están asociados a distintas vías de señalización. Los receptores dopaminérgicos de tipo D1 están acoplados a proteínas  $G_{ac}$  y  $G_{olf}$  que estimulan a la adenilato ciclasa y aumentan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (Neve *et al.*, 2004). Esto hace que la activación de dichos receptores facilite la excitabilidad de las NEM. Por otro lado, los receptores de tipo D2 están acoplados a proteínas  $G_{oi}$  y  $G_o$  (Neve *et al.*, 2004) que inhiben a la adenilato ciclasa y canales de  $Ca^{2+}$ , incrementan la conductancia de  $K^+$ , activan a la bomba  $Na^+/H^+$  y a la fosfolipasa C (Neve *et al.*, 2004). Esto hace que sea más difícil excitar a las NEM. Por lo tanto, la dopamina modula la apertura y cierre de canales ionotrópicos, cambiando la forma en la que las NEM responden a las entradas glutamatérgicas (Surmeier *et al.*, 2007).

En términos funcionales, usando el modelo clásico de los ganglios basales se puede explicar que cuando la dopamina actúa sobre las NEM de la vía directa favorece su activación y la subsecuente inhibición de los núcleos de salida (GPi/SNr). Por otro lado, al actuar sobre las NEM de la vía indirecta favorece la inhibición de esta vía, por lo que las

neuronas del GPe permanecerán activas inhibiendo al núcleo subtalámico, lo que disminuye la actividad de los núcleos de salida (GPi/SNr). El resultado final en ambos casos es disminuir la activación de los núcleos de salida que a su vez favorecerá la activación del circuito tálamo-cortical, facilitando las entradas a las regiones motoras. Dado que la dopamina es un modulador crucial de la salida de información motora del estriado (Wickens *et al.*, 2003), la degeneración de la vía dopaminérgica nigro-estriatal provoca cambios a ambas vías de manera diferencial. Disminuye la activación de las NEM de la vía directa mientras que incrementa la activación de la vía indirecta, y como resultado al desbalance observado se presentan los síntomas motores de la EP (Drucker-Colín and Anías-Calderón, 2005).

## Modelos animales de la EP

Los modelos de la EP se pueden dividir en dos enfoques: aquellos utilizados para el estudio de los mecanismos de muerte celular y aquellos enfocados al estudio de los mecanismos subyacentes a los diversos síntomas de la enfermedad. A su vez, los modelos se pueden dividir en dos tipos: los modelos genéticos y los inducidos por la administración de neurotoxinas.

Los modelos genéticos tienen como objetivo principal el estudio de las vías de señalización asociadas a la muerte de las células asociadas a mutaciones conocidas (Blesa *et al.*, 2012). Además buscan fenotipos de la enfermedad que se asemejen y en última instancia realizar estudios terapéuticos. Diversas mutaciones genéticas se han asociado

principalmente a tipos de Parkinson familiares, que representan al menos al 10% del total de la población con EP (Dauer and Przedborski, 2003). En la actualidad los modelos genéticos disponibles incluyen mutaciones de  $\alpha$ -sinucleína, parkin, LRRK2, PINK1 y DJ-1. Además se han utilizado modelos invertebrados que proveen una herramienta más simple para entender las vías genéticas y moleculares implicadas en la EP, dando las bases para su posterior estudio o aplicación en modelos de mamíferos.

Por otro lado, el enfoque de los modelos que emplean neurotoxinas es distinto a los modelos genéticos. Éstos permiten el estudio de las alteraciones asociadas a la disminución de dopamina dentro del estriado ocasionadas por la degeneración de la vía nigroestriatal. Dentro de estos modelos se encuentran la administración de 6-hidroxydopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). En general, en ambos casos la muerte de las células se asocia a la sobre-producción de especies reactivas de oxígeno que desencadenan vías de señalización asociadas a la muerte celular. El MPTP es más utilizado en primates no humanos y ratones. Esta molécula es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que su administración se realiza sistémicamente, ocasionando daño celular central y bilateral. Dentro del cerebro, el MPTP es metabolizado por los astrocitos y transformado en MPP<sup>+</sup> por la monoamina oxidasa-B, produciéndose así el metabolito activo que posteriormente es liberado e ingresado a las neuronas dopaminérgicas por el transportador de dopamina. Dentro de la neurona, el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial es inhibido, resultando en el incremento de especies reactivas de oxígeno y en la reducción de ATP (Blesa *et al.*, 2012). Este es uno de los mecanismos asociados a la muerte de las células a través de MPTP. Sin embargo, una de las desventajas asociadas al modelo, además de su volatilidad que pone en riesgo la

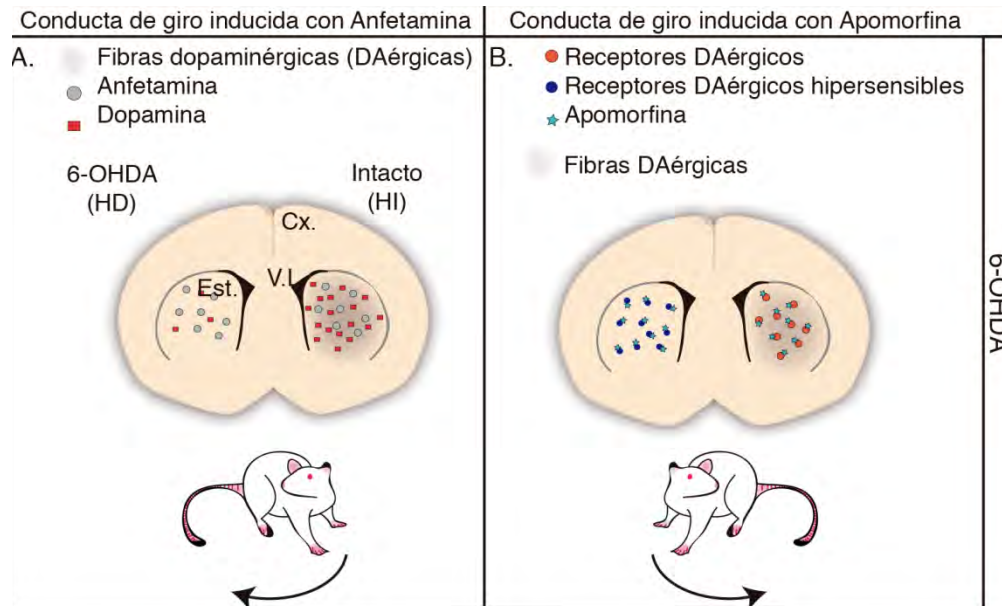
salud del investigador, es que la destrucción de las neuronas dopaminérgicas puede ser parcial y transitoria, reduciendo la expresión de la enzima TH y la subsecuente producción de dopamina (Sedelis *et al.*, 2001). Esto provoca que los efectos observados puedan ser reversibles y dependientes de la administración continua de la neurotoxina, requiriendo inyecciones diarias para un efecto mas duradero (Sedelis *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 1997).

Por otro lado, la neurotoxina 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que su administración requiere de cirugía estereotáxica para ingresar al sitio blanco (principalmente SNpc y estriado). Esta neurotoxina se emplea principalmente en ratas. La 6-OHDA destruye las neuronas dopaminérgicas de manera irreversible y por lo tanto la manifestación de síntomas motores son estables en el tiempo. El mecanismo de acción consiste en que al ingresar a la neurona mediante los trasportadores de dopamina y noradrenalina, desencadena la formación de especies reactivas de oxígeno. El proceso de oxidación de la neurotoxina se lleva a cabo por medio de la monoamino oxidasa, generando la producción de peróxido de hidrógeno citotóxico (Simola and Morelli, 2007) que conlleva a alteraciones estructurales, de metabolismo y finalmente muerte celular (Blesa *et al.*, 2012). Este modelo es el mas utilizado debido a sus correlatos conductuales que son fácilmente observables y replicables.

## Estudio de las alteraciones motoras en el modelo de 6-OHDA de la EP

La 6-OHDA se utiliza unilateralmente, provocando la destrucción de la vía dopaminérgica nigro-estriatal de un hemisferio. La lesión unilateral esta asociada a la conducta

estereotipada de giro inducida mediante la administración de agonistas dopaminérgicos (*e.g.* anfetamina y apomorfina) (Figura 3). La conducta de giro permite evaluar a nivel farmacológico la liberación estimulada de dopamina (inducida por anfetamina), y la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos (al estimular los receptores dopaminérgicos con apomorfina) provocada por la disminución de dopamina dentro del estriado (Figura 3A). La administración de los agonistas produce una conducta de giro contralateral o ipsilateral al hemisferio dañado dependiendo del agonista utilizado. En el caso de la administración de anfetamina se estimula la liberación de dopamina, provocando que los animales lesionados giren ipsilateralmente al hemisferio lesionado (Figura 3A). Esto se debe a que en el estriado del hemisferio lesionado no hay terminales dopaminérgicas de donde se pueda liberar el neurotransmisor, al contrario del hemisferio contralateral (intacto) donde sí será liberado (Figura 3A). En el caso de la administración de apomorfina (agonista de receptores dopaminérgicos) se activan directamente los receptores dopaminérgicos, provocando una conducta de giro contralateral al hemisferio lesionado (Figura 3B). Esto se debe a que la disminución de dopamina hipersensibiliza a los receptores post-sinápticos dopaminérgicos en el hemisferio lesionado, por lo que la apomorfina activara mayoritariamente dicho hemisferio (Figura 3B), contrario a lo que sucede tras la administración de anfetamina. Por lo tanto, la prueba de giro inducida con agonistas dopaminérgicos permite el estudio de los efectos de la disminución de dopamina sobre la neurotransmisión dopaminérgica.



**Figura 3. Esquema de la conducta de giro inducida con anfetamina y apomorfina en el modelo de lesión unilateral de 6-OHDA.** La prueba de giro inducida con anfetamina (A) o apomorfina (B) en el modelo de lesión con 6-OHDA en rata. (A) Representación de un corte coronal del cerebro de rata, señalando la corteza (Cx), el estriado (Est.) y los ventrículos laterales (V.L.). Las fibras dopaminérgicas están representadas con una sombra café, la cual no se presenta en el hemisferio lesionado con la neurotoxina 6-OHDA (hemisferio derecho, HD). La administración de anfetamina (círculos grises) promueve la liberación de dopamina (cuadrados rojos) desde las terminales intactas dopaminérgicas en el estriado, incremento desproporcionalmente la concentración de dopamina en el hemisferio no lesionado respecto al hemisferio lesionado, dado que este último contiene menos terminales dopaminérgicas. La asimetría en los niveles extracelulares de dopamina entre ambos hemisferios induce la conducta estereotipada de giro, ipsilateral al hemisferio lesionado (señalado en la figura como la curvatura de la flecha). (B) La administración de apomorfina, agonista de receptores dopaminérgicos (DAérgicos), activa a los receptores DAérgicos post-sinápticos del estriado (círculos naranjas). La denervación DAérgica provoca hipersensibilidad en los receptores DAérgicos (representados como círculos azules), por lo que la apomorfina (estrellas turquesa) incrementa la actividad en el hemisferio lesionado en mayor medida respecto al hemisferio no lesionado. Esto genera que el animal gire hacia el lado contralateral al lesionado (señalado en la figura con la curvatura de la flecha). Cx: Corteza; HD: hemisferio derecho; HI: Hemisferio izquierdo, V.L.: Ventrículos laterales; Est: Estriado. Boronat-García *et al.*, 2017

El modelo de 6-OHDA permite el estudio de otras conductas sensorio-motoras no asociadas a la administración de fármacos y que son también sensibles al grado de lesión dopaminérgica. Dentro de estas conductas se encuentran el uso asimétrico de las patas, la

iniciación del movimiento, negligencia somatosensorial, y la coordinación motora (Drucker-Colín and García-Hernández, 1991; Schallert *et al.*, 1983; Whishaw *et al.*, 1986). La mayor parte de los estudios realizados en relación a la degeneración de la vía dopaminérgica nigro-estriatal derivan de modelos de neurotoxina que son ampliamente utilizados para evaluar tratamientos enfocados en disminuir las alteraciones motoras.

### Tratamientos de la EP

Los tratamientos para la EP están enfocados en disminuir los síntomas motores. Conforme la enfermedad progresa algunos de los tratamientos dejan de ser efectivos y además aparecen otro tipo de complicaciones asociadas al tratamiento farmacológico. El más usado y efectivo es la administración del precursor de dopamina levodopa (*i.e.* L-DOPA), enfocado en reestablecer los niveles de dopamina en los ganglios basales. Conforme la enfermedad progresa el fármaco pierde eficacia y dosis mayores son necesarias. Esto conlleva a la aparición de efectos secundarios (e.g. discinecias) atribuidas a la estimulación intermitente y sin regulación fisiológica de los receptores dopaminérgicos, junto con los efectos sobre blancos no deseados por la administración oral (Huot *et al.*, 2013; Jenner, 2003).

Otros enfoques terapéuticos implican la administración de agentes preventivos cuyo objetivo es retrasar el progreso de la enfermedad (*e.g.* agentes antioxidantes, queladores de hierro). El uso de estos agentes no ha mostrado resultados robustos y duraderos en pacientes con EP y su mayor limitante es que el diagnóstico se da en etapas avanzadas lo que disminuye la posibilidad de enlentecer el proceso degenerativo (Salat *et al.*, 2016).



Otras aproximaciones implican la implantación de electrodos de estimulación profunda (dentro del tálamo, GPi o núcleo subtalámico) y la cirugía ablativa (palidotomía y talamotomía) (Fasano *et al.*, 2012). En general, estas aproximaciones han mostrado la disminución de las alteraciones motoras, sin embargo son invasivos, costosos y puede traer complicaciones severas cuando no están bien aplicados (Fasano *et al.*, 2012). Además, no todos los pacientes son candidatos y los resultados mas robustos se observan en pacientes jóvenes (Fasano *et al.*, 2012). Dentro de este mismo campo de tratamientos invasivos, la terapia celular ha sido también probada en ensayos clínicos en pacientes con EP (Barker *et al.*, 2015), mostrando resultados diversos desde mejoras importantes durante tiempo prolongado hasta nulas, dependiendo de la fuente celular utilizada. Puesto que el presente trabajo se relaciona a esta última aproximación, la siguiente sección aborda esta perspectiva en mas detalle.

## Terapia de reemplazo celular en la EP

La terapia de reemplazo celular fue propuesta como alternativa a la terapia farmacológica durante la década de los ochenta. Su enfoque se basa en reemplazar la dopamina faltante dentro del estriado mediante el trasplante de células que produzcan y liberan eficientemente dopamina. Existen dos aproximaciones dependientes del sitio de trasplante: en el estriado o regiones adyacentes y en la SNpc. Hasta hace poco, el estriado había sido el único sitio viable en términos de sobrevivencia y efectos funcionales de las células trasplantadas, sin embargo recientemente se ha observado que el trasplante dentro de la SNpc en modelo animal de la EP sobrevive, genera proyecciones específicas hacia el estriado y finalmente

libera dopamina dentro del sitio (Grealish *et al.*, 2014). Mas estudios son necesarios para determinar la reproductividad y los efectos funcionales.

Dentro de las fuentes celulares utilizadas en la terapia de reemplazo para la EP se encuentran células FMV, CC de la médula adrenal, neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias o derivadas de células pluripotentes inducidas (Guerra-Crespo *et al.*, 2011), por mencionar algunas. Históricamente, las células FVM y las CC de la médula adrenal fueron las primeras en ser utilizadas tanto en modelos animales y en pacientes con EP.

Las CC se encuentran principalmente en la médula de la glándula adrenal y contienen y liberan catecolaminas (incluyendo dopamina) así como factores tróficos. Fueron propuestas como fuente celular por sus características y su fácil obtención de tejido adulto. Los efectos funcionales observados tanto en modelos animales como en pacientes con EP del trasplante de CC son variados, desde mejoras moderadas a nulas. La variabilidad observada deriva principalmente del mecanismo de acción subyacente a los efectos funcionales de su trasplante (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005). Por un lado, las CC de la médula adrenal son principalmente de fenotipo adrenérgico y noradrenérgico y sólo el 1% de la población son dopaminérgicas, fenotipo que parece permanecer posterior a su trasplante (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005). Esto resulta en que los efectos observados no provengan principalmente de la liberación directa de dopamina desde las células trasplantadas (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005). Por otro lado, las CC también secretan moléculas tróficas que se han asociado a otro mecanismo de acción relacionado con un efecto neuroprotector sobre las terminales dopaminérgicas remanentes del hospedero. Existe evidencia derivada de estudios realizados en el modelo de lesión con MPTP que

apoya esta idea. Se ha observado que animales con trasplante de CC promueve la reaparición de TH en el estriado lesionado de forma más rápida que en animales sin trasplante (Bankiewicz et al., 1988; Bohn et al., 1987; Date et al., 1990; Fiandaca et al., 1988). Sin embargo, algunos estudios han logrado determinar que inclusive en ausencia de algún efecto sobre las fibras dopaminérgicas endógenas, el contenido de dopamina dentro del estriado incrementa en animales con trasplante de CC (Nishino *et al.*, 1988), generando un panorama donde no hay un mecanismo claro sobre los efectos del trasplante de CC. Además, no podemos descartar el papel de las otras catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) puesto que también son agonistas de receptores dopaminérgicos (Lanau *et al.*, 1997; Root *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de la diversidad de resultados derivados sobre el mecanismo de acción de las CC, el consenso actual apoya principalmente a la hipótesis de efecto neuroprotector (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005). Por otro lado, independientemente del mecanismo de acción del trasplante de CC, se ha observado que la sobrevivencia de estas células es muy baja, limitando sus efectos funcionales en el tiempo además de mostrar resultados altamente variables. Al ser comparadas directamente con trasplante de células FVM sus efectos y sobrevivencia son menores (Brown and Dunnett, 1989). En conjunto, las observaciones derivadas de una baja sobrevivencia generaron que se adoptaran diversas estrategias para incrementar la sobrevivencia de las CC al ser trasplantadas en modelos animales de la EP. Dentro de estas estrategias, las que han mostrado mejores resultados son técnicas que utilizan el factor de crecimiento neuronal (NGF) añadido al cultivo para trans-diferenciar a las CC y posteriormente trasplantarlas (Cunningham *et al.*, 1991; Drucker-Colín *et al.*, 1994), o el trasplante de CC junto con bombas liberadoras de NGF (Strömberg *et al.*, 1985), o trasplantar CC junto con células productoras de NGF (Bing *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1991; Nijima *et al.*, 1995).

Estas estrategias incrementan la sobrevivencia de las células aproximadamente 4 veces en comparación a CC sin tratamiento, pero los resultados conductuales siguen siendo moderados.

Por otro lado, las células FVM han mostrado mejores efectos sobre las alteraciones motoras y una mayor sobrevivencia al ser trasplantadas en modelos animales y en pacientes con EP (Barker *et al.*, 2015; Björklund and Stenevi, 1979; V. Brown and Dunnett, 1989; Perlow *et al.*, 1979). El mecanismo subyacente está relacionado a la liberación de dopamina proveniente de las células trasplantadas, además se ha observado que las células son capaces de extender proyecciones de manera prominente, contrario a las CC. También se ha determinado que las células son capaces de reestablecer los niveles de dopamina liberada dentro del estriado (Brundin *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1994, 1995; Zetterstrom *et al.*, 1986), disminuir la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos (Rioux *et al.*, 1991) y establecer conexiones con células endógenas (Arbutnott *et al.*, 1985; Sørensen *et al.*, 2005). Sin embargo, el trasplante de células FVM también se ha asociado a efectos negativos como la aparición de discinesias inducidas por el trasplante, tanto en pacientes como modelos animales (Aldrin-Kirk *et al.*, 2016; Barker *et al.*, 2015). Otro factor que ha limitado el uso de estas células es su origen fetal, pues involucra problemas éticos que deben ser considerados. Es importante señalar que la mayor parte de los estudios que se realizan en esta área utilizan células FVM y son consideradas junto con las neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias, las fuentes celulares más prometedoras (Björklund and Kordower, 2013). En el caso de las células pluripotentes inducidas, son hasta ahora una fuente que también ha mostrado resultados favorables pero que no han mostrado ser completamente seguras, pues se han asociado a la formación de

tumores dados por la presencia de células pluripotentes remanentes en el trasplante (Ben-David and Benvenisty, 2011; Okita *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2006). Esto último ha limitado su uso.

Actualmente, se ha sugerido que la búsqueda de una fuente celular ideal para la terapia de reemplazo en la EP debe estar guiada por los siguientes requerimientos (Lindvall, 2013): derivar de tejido humano, que una gran proporción de células se diferencien a fenotipo dopaminérgico (específicamente mostrando propiedades similares a las neuronas de la SNpc) y producir mejoras motoras significantes después de ser trasplantadas en modelos animales de la EP, sin efectos secundarios asociados como las discinesias o generación de tumores. Además es preferible que sean de fácil obtención y mantenimiento en cultivo.

### Células de tipo progenitor de células cromafines: Cromoesferas

Las CC de la médula adrenal son células neuroendócrinas derivadas de la cresta neural. Junto con las neuronas simpáticas de ganglionares y las células pequeñas intensamente fluorescentes, constituyen el linaje simpático-adrenérgico. A lo largo de su ruta migratoria, los progenitores simpático-adrenérgicos se agregan en la aorta dorsal para posteriormente migrar al ganglio secundario simpático y a la médula adrenal, donde se diferencian en neuronas simpáticas y CC, respectivamente (Huber *et al.*, 2009). En la médula adrenal, las CC adquieren un fenotipo endócrino y se especializan en la síntesis y secreción de catecolaminas. Estas células tienen morfología redonda y carecen de los axones y dendritas característicos de las neuronas simpáticas.

Una de las características de las CC es su propiedad plástica, que incluye la capacidad de proliferar en etapa adulta (Sicard *et al.*, 2007; Tischler *et al.*, 1989; Verhofstad, 1993) y la capacidad de trans-diferenciarse bajo señales ambientales específicas, como en presencia de NGF (Doupe *et al.*, 1985; Francis and Landis, 1999; Unsicker *et al.*, 1978). Esto ha sugerido que las células del linaje simpático-adrenal derivan de un progenitor embrionario común (Doupe *et al.*, 1985; Olson, 1970; Unsicker *et al.*, 1978). De los tres tipos celulares provenientes del linaje simpático-adrenal, la hipótesis más aceptada es que las neuronas simpáticas y las CC derivan de un progenitor común de carácter bipotente (Anderson *et al.*, 1991; Carnahan and Patterson, 1991; Huber, 2006). Además, se ha sugerido que dentro de la médula adrenal adulta existen progenitores simpático-adrenales que dan origen a nuevas CC en respuesta a estímulos ambientales y necesidades fisiológicas (Powers *et al.*, 2007).

Recientemente, Ehrhart-Bornstein y colaboradores desarrollaron un protocolo de cultivo celular que permite la expansión de células tipo progenitores de CC de la médula adrenal de ratón postnatal (Saxena *et al.*, 2013), y de bovino (Chung *et al.*, 2009) y humano (Santana *et al.*, 2012) adultos. En condiciones de cultivo de baja adherencia, estas células se agregan formando estructuras esféricas, a las cuales han llamado cromoesferas. Las células de las cromoesferas tienen capacidad limitada de auto-renovación y forman esferas secundarias clonales en cultivo (Chung *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2013). Se ha visto que expresan niveles mayores de RNAm de marcadores simpático-adrenales y de progenitores neurales como Nestina, Mash1, Vimetina, Musashi-1 así como marcadores de la cresta neural (*e.g.* Sox1 y Sox10) (Chung *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2013; Vukicevic, Schmid, *et al.*, 2012) en comparación a CC que expresan niveles bajos o nulos de dichos marcadores.

Además, se ha visto que un porcentaje significativamente mayor de células derivadas de cromoesferas adquieren un fenotipo dopaminérgico y extienden proyecciones, en comparación a CC (Vukicevic *et al.*, 2012). El porcentaje de células derivadas de las cromoesferas con fenotipo dopaminérgico puede ser incrementado mediante protocolos de cultivo de diferenciación que involucran la adición de ácido ascórbico y ácido retinoico, duplicando el fenotipo dopaminérgico junto con la liberación de dopamina y favoreciendo la neuralización de las células (Vukicevic *et al.*, 2012).

A nivel clínico, las células derivadas de la médula adrenal pueden ser obtenidas de tejido adulto evitando el uso de tejido fetal. Además, el incremento observado en el fenotipo dopaminérgico de células derivadas de las cromoesferas relativo a CC, junto con el hecho de que pueden ser manipuladas en cultivo para incrementar dicho fenotipo, abre las puertas a un potencial uso de las cromoesferas en la terapia de remplazo celular para la EP. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue examinar algunas de las propiedades moleculares y funcionales *in vitro* de las cromoesferas derivadas de bovino adulto y probar sus efectos tras ser trasplantadas en el estriado de animales lesionados con 6-OHDA.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El trasplante de cromoesferas mejora las alteraciones en la conducta motora en el modelo de 6-OHDA de la EP?

## HIPÓTESIS

El trasplante de cromoesferas mejora las alteraciones en la conducta motora en el modelo de 6-OHDA de la EP.



## OBJETIVOS

### General

Evaluar la viabilidad del trasplante de cromoesferas a nivel celular y funcional en el modelo de 6-OHDA de la EP.

### Particulares

1. Determinar si las cromoesferas se diferencian hacia el fenotipo dopaminérgico.
2. Evaluar la sobrevivencia de las cromoesferas trasplantadas en el modelo de 6-OHDA la EP.
3. Evaluar los efectos del trasplante de cromoesferas sobre la conducta motora en el modelo de 6-OHDA de la EP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratas adultas macho (250-280 g) mantenidas bajo las mismas condiciones con un ciclo de 12 h luz/oscuridad y acceso *ad libitum* a comida y agua. Los procedimientos realizados fueron aprobados siguiendo los lineamientos de nuestra Institución Local de Cuidado de Animales, basados en estándares nacionales e internacionales.

### Cultivo de células cromafines (CC) y cromoesferas

Con el fin de aprender el aislamiento y cultivo de cromoesferas, se realizó una estancia en la Universidad Técnica de Dresden (Alemania) en el laboratorio de la Dra. Monika Bornstein-Enrhart. El cultivo fue implementado en el laboratorio del Dr. René Drucker-Colín, donde se corroboraron algunas de las características de estas células previamente reportadas (Vukicevic, Schmid, *et al.*, 2012).

Las glándulas adrenales de bovino se obtuvieron del rastro frigorífico La Paz (Los Reyes Acaquilpan, México). Para su transporte al laboratorio, las glándulas se colocaron en buffer de fosfato Dulbecco 1x (Sigma-Aldrich, D8537) suplementado con 2% de solución de antibiótico (penicilina-estreptomina, P-E) y antimicótico (Sigma-Aldrich, A5955) mantenido a 4°C. Dentro del laboratorio, las glándulas se colocaron brevemente en alcohol al 70% y se removió el tejido conectivo, la grasa y otras estructuras para sólo quedarse con las glándulas. Para eliminar la sangre, las glándulas fueron lavadas con buffer de fosfato Dulbecco 1x suplementado con 2% P-E, inyectado con una jeringa de 40 ml directamente en la vena central. Finalmente, se inyectó una mezcla de DNasa (30 unidades/ml, Sigma-

Aldrich) y Colagenasa tipo II (0.3%, Sigma-Aldrich) para la disociación enzimática de la médula adrenal, colocadas en un frasco en baño maría a 37°C durante 35 minutos, seguidas de una segunda inyección de enzimas y colocadas nuevamente en baño maría durante 20 minutos adicionales. Posteriormente, se realizó un corte longitudinal de la glándula para tener acceso a la médula disociada. Las células disociadas fueron recolectadas en cajas Petri agregando buffer de fosfato Dulbecco 1x para homogenizar la muestra. Una vez homogenizada la muestra, se filtró por un colador de metal de aproximadamente 300 µm de diámetro seguido de una gasa y finalmente por coladores de 100 y 70 y nuevamente 70 µm (Becton Dickinson). Se realizaron de dos a tres lavados con buffer de fosfato Dulbecco 1x, centrifugando a 1000 rpm durante 8 minutos cada vez. En el último lavado, las células fueron colocadas dentro de una botella de cultivo adherente (Starstedt) suspendidas en medio recién preparado: DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) y 2% P-E. Se mantuvieron a 37°C en atmósfera humedecida (95% aire, 5% CO<sub>2</sub>) durante toda la noche.

Al día siguiente, las CC y de tipo progenitoras fueron separadas del resto de células (*e.g.* células de la corteza adrenal, fibroblastos) utilizando sembrado diferencial (Vukicevic, Schmid, *et al.*, 2012). El sembrado diferencial consiste en despegar las células del frasco y colocarlas en un nuevo frasco de cultivo (adherente) durante 2 h, posteriormente se toma el sobrenadante y se colocan en un nuevo frasco por 1 h repitiendo este paso una vez más. Las células aisladas fueron sembradas en medio recién preparado Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% de suplemento-B27 (Gibco), 2mM de L-glutamina (PAA laboratorios), 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFb, Sigma-Aldrich) y 2% de P-E, y fueron colocadas en un frasco de baja adherencia (Starstedt) para permitir la

formación de cromoesferas. Para el cultivo de CC, después del sembrado diferencial las células fueron sembradas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2% P-E en platos adherentes. El medio fue cambiado cada dos días.

### Medición de catecolaminas liberadas *in vitro* con HPLC

Las CC de 3 y 9 días de cultivo y las cromoesferas de 9 días de cultivo, fueron sembradas a una densidad de 30 000 células por pozo en cajas de 24 pozos previamente tratadas (poli-L-Lisina (4 µg/ml) y laminina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich)) para incrementar la adherencia de las células. Se incubaron por 1 h en medio de cultivo para permitir su adherencia al substrato. Posteriormente, el medio de cultivo fue substituido con 400 µl de solución fisiológica (140 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 1 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), y las células fueron incubadas por 5 minutos a 37°C en una atmósfera humedecida (95% aire, 5% CO<sub>2</sub>) en completa oscuridad. La solución extracelular fue recolectada y suplementada con 0.01 M de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) para evitar la oxidación de las catecolaminas. Las muestras fueron analizadas usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) acoplado a un detector electroquímico. Las muestras estándares utilizadas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) para calibrar se diluyeron en solución fisiológica con 0.01 M de HClO<sub>4</sub>. La fase móvil consistió en agua grado HPLC conteniendo: 0.15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM octil-sulfato de sodio y 12.5% (v/v) metanol. El pH fue ajustado a 3.8 con 1 M de HClO<sub>4</sub>. La fase móvil y las muestras fueron filtradas antes de ser utilizadas. 20 µl de cada muestra fueron inyectados para el análisis utilizando un auto inyector Rheodyne 734 (Gilson Inc, Middleton USA). La detección electroquímica fue realizada usando un detector LC-3C (BAS) (750 mV vs Ag/AgCl) con electrodo de carbón. El flujo utilizado

fue de 1 ml/min usando una bomba 305-Gilson. Para la separación de las moléculas se utilizó una columna C18 (nucleosil 5 C18, ODS, 100A 150 x 4.6 mm). La concentración final de las catecolaminas esta expresada en nmol y fue obtenida utilizando como referencia para la regresión lineal el área bajo la curva de los estándares dada la concentración. De cada catecolamina se utilizaron 7 concentraciones distintas (0.2, 0.4, 1.4, 2, 3, 4 y 5 pmol) para realizar las curvas estándares.

### Lesión del sistema nigro-estriatal con 6-OHDA y trasplante

Para generar el modelo de lesión unilateral de la EP, los animales fueron anestesiados con un coctel de ketamina/xilasina (100 y 10 mg/kg) inyectado intraperitonealmente (i.p.). Los animales anestesiados fueron colocados en un aparato de cirugía estereotáxica para la inyección de solución salina (0.5  $\mu$ l volumen total) suplementada con 40  $\mu$ g de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 0.02% de ácido ascórbico inyectada en la SNpc izquierda (- 4.7 mm AP,  $\pm$  1.6 mm ML, -8.2 mm DV, respecto a Bregma 0) (Paxinos atlas). Para el trasplante de cromoesferas y CC, 18 días después de la lesión con 6-OHDA, los animales fueron anestesiados nuevamente con ketamina/xilasina. Las células fueron re-suspendidas en Optimem (Gibco) para alcanzar una densidad de  $\sim 3 \times 10^5$  células en 4  $\mu$ l. Las células fueron inyectadas en el estriado izquierdo (lesionado) (+ 1.0 mm AP,  $\pm$  3.0 mm ML, - 5.3 (2  $\mu$ l) and - 5.0 (2  $\mu$ l) DV, respecto a Bregma 0). Una vez inyectado el volumen completo de la 6-OHDA y las células trasplantadas, la cánula se mantuvo en el sitio por 5 min para prevenir cualquier flujo retrogrado. 24 h antes del trasplante, los animales se inmunosuprimieron con ciclosporina A (10 mg/kg) administrada oralmente. El inmunosupresor se administro diariamente hasta el sacrificio de los animales.

## Conducta de giro

Para medir el desbalance de la neurotransmisión dopaminérgica generada por la destrucción unilateral de la vía nigro-estriatal, se utilizó la prueba de giro. Dos agonistas dopaminérgicos fueron utilizados para inducir la conducta de giro estereotipada: anfetamina (i.p. 4 mg/kg) y apomorfina (s.c. 2mg/kg) (García-Montes *et al.*, 2012). El número de giros izquierdos y derechos fueron registrados durante 90 y 30 minutos dependiendo del fármaco empleado (anfetamina y apomorfina, respectivamente). Los giros fueron registrados mediante un sistema computarizado acoplado a un detector de movimiento. La prueba se realizó una y dos semanas después de la lesión con 6-OHDA y solo aquellos con > 500 giros ipsilaterales inducidos con anfetamina o > 300 giros contralaterales inducidos con apomorfina fueron utilizados para los experimentos posteriores. Los animales trasplantados (6-OHDA+cromoesferas, 6-OHDA+CC) y los grupos control (6-OHDA, 6-OHDA+vehículo, Sham, Sin daño) se evaluaron 1, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas post-trasplante o en tiempos equivalentes. Los resultados se presentarán como porcentaje de cambio en el número de giros observados posterior al trasplante en función al número de giros previos al trasplante. Como criterio de inclusión utilizamos solo aquellos animales cuyo número de giros obtenidos durante las evaluaciones realizadas 1 y/o 2 semanas post-trasplante disminuyeron  $\geq 10\%$  relativo a su número inicial pre-trasplante. Este criterio fue utilizado en todos los experimentos exceptuando en el experimento de la relación de sobrevivencia y mejora (Figura 13) donde todos los animales fueron incluidos.

## Prueba de la viga

Para evaluar la coordinación motora se utilizó la prueba de la viga descrita previamente (Drucker-Colín and García-Hernández, 1991). Los animales (previo a la lesión con 6-OHDA) fueron entrenados durante 3 días para caminar sobre una viga de madera de 2 m de longitud inclinada 15°. Esta prueba utiliza 5 grosores distintos de viga (24, 18, 12, 6 y 3 mm) en los que el animal debe caminar desde el punto de inicio hasta el punto final. Durante la fase de entrenamiento, cada animal debe realizar la tarea para cada grosor, comenzando desde la viga mas gruesa hasta la mas delgada. Los animales recibieron una recompensa al completar la tarea. Cuatro días después del inicio del entrenamiento, previo a la lesión con 6-OHDA, los animales fueron evaluados por primera vez, seguido de una segunda evaluación una semana después. Durante las evaluaciones se midió el tiempo que le toma al animal llegar desde el punto inicial hasta el punto final (*i.e.* tiempo total) y el tiempo en el que el animal pasa sin moverse durante la prueba (*i.e.* tiempo de no movimiento). En cada evaluación la secuencia utilizada de cada grosor de viga fue elegida al azar, pasando por todos los grosores. Para asegurar que solo aquellos animales capaces de realizar la tarea sin ningún problema eran incluidos previo a cualquier manipulación (*e.g.* lesión y trasplante) se seleccionaron sólo a los animales que completaron la tarea en menos de 120 s en cada grosor sin ninguna dificultad durante las dos primeras evaluaciones. Los valores obtenidos en las primeras dos evaluaciones fueron promediados y utilizados como línea base. Los animales fueron evaluados dos veces posterior a la lesión con 6-OHDA, y sólo aquellos con una ejecución deficiente (*i.e.* indicando una lesión exitosa) fueron incluidos en el experimento como parte del grupo 6-OHDA y 6-OHDA+cromoesferas. Todos los animales fueron evaluados 1, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas post-

trasplante o a tiempos equivalentes en aquellos grupos sin trasplante. Durante las evaluaciones posteriores a la lesión, los animales que requerían mas de 120 s para completar la tarea o que caían al piso mientras la realizaban, se les asignó automáticamente un tiempo total y de no movimiento de 120 s.

## Histología

Como ha sido descrito anteriormente (García-Montes *et al.*, 2012), los animales fueron sacrificados con una inyección letal (i.p.) de pento-barbital sódico (60 mg/kg) y perfundidos transcardialmente con 250 ml de 0.1 M de buffer de fosfatos seguido de 250 ml de paraformaldehído (4% peso/volumen en 0.1 M de buffer de fosfatos). El cerebro de cada animal fue recolectado y post-fijado por 12 h en 4% paraformaldehído. Los cerebros post-fijados se colocaron en sacarosa al 10%, 20% y 30% durante 24 h en cada concentración para proteger el tejido. Se obtuvieron cortes coronales del estriado y de la SNpc de 40  $\mu$ m recolectados en orden secuencial. Para los experimentos *in vitro*, las células se fijaron en 4% paraformaldehído durante 30 min previo a cualquier manipulación (*e.g.* corte de cromoesferas e inmunofluorescencia).

Los anticuerpos utilizados fueron conejo y ratón anti-TH (1:1000, EMD Millipore) y conejo anti-DBH (1:350, Abcam). Los anticuerpos secundarios fluorescentes (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories) o biotinilados (1:250, Vector Laboratories) apropiados para cada anticuerpo primario fueron utilizados para su visualización en microscopio. Para el marcaje de TUNEL se utilizó el kit de detección *in situ* de muerte celular con rojo-TMR (Roche), siguiendo el protocolo de tejido difícil recomendado por el fabricante.



Para evitar el marcaje inespecífico, las muestras (cortes de cerebro o células pegadas) se incubaron de 1-2 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo compuesto de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y 3% de suero normal de caballo (para fluorescencia) o 2% de albumina (para histoquímica) en 0.1 M de buffer de fosfato. Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente en anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 24 h. El anticuerpo secundario fluorescente fue disuelto en 0.1 M de buffer de fosfato y aplicado a las muestras durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario biotinilado se disolvió en solución de bloqueo y se aplicó durante 2 h a temperatura ambiente. Para la detección del complejo de anticuerpos primario-secundario biotinilado se utilizó la reacción de precipitación de diaminobencidina (Sigma-Aldrich) mediante agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) y peroxidasa, previamente amplificada con estreptavidina-biotina (Vector Labs).

### Microscopia y cuantificación de células TH

Las muestras fueron examinadas con microscopia confocal (Leica y Olympus FV1000), microscopía de epifluorescencia y microscopia estereoscópica (Leica EZ4D). Para analizar las imágenes obtenidas se utilizó el programa Image J (NIH). Todas las imágenes de cada muestra fueron adquiridas utilizando las mismas condiciones (exposición, brillo, niveles gama). Para las reconstrucciones de los trasplantes en la Figura 11b (reconstrucción del trasplante de la imagen del lado derecho) y Figura 11e, las fotografías fueron tomadas con microscopio confocal y la reconstrucción fue realizada manualmente sólo en el sitio del trasplante.

**Conteo celular para los experimentos *in vitro*:** Las muestras se obtuvieron de 3 cultivos independientes y cada glándula adrenal se trato como muestra independiente. Las CC de muestras separadas (n = 6) fueron directamente sembradas en cubre-objetos redondos tratados (poli-L-Lisina (4 µg/ml) y laminina (5 µg/ml)) y fijadas con paraformaldehído 4%. En el caso de las cromoesferas analizadas de muestras independientes (n = 3) primero fueron centrifugadas para su recolección, fijadas con paraformaldehído 4% seguido de sacarosa (10, 20 y 30%) y finalmente cortadas a un grosor de 20 µm para realizar los marcajes. Para cada muestra, se capturaron imágenes aleatorias de alta resolución en el plano z a una magnificación de 40x utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000. Se contaron el número de células que expresan TH, DBH, ambos y el total de células marcadas con DAPI para identificar los núcleos. El número de células TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup> o TH<sup>+</sup>/DBH<sup>+</sup> fue normalizado al número total de núcleos contados (de 50 a 300 núcleos se contaron por muestra) y se expresan como porcentajes del total de número de células presentes en la imagen analizada.

**Conteo del número de células trasplantadas que sobrevivieron en el estriado:**

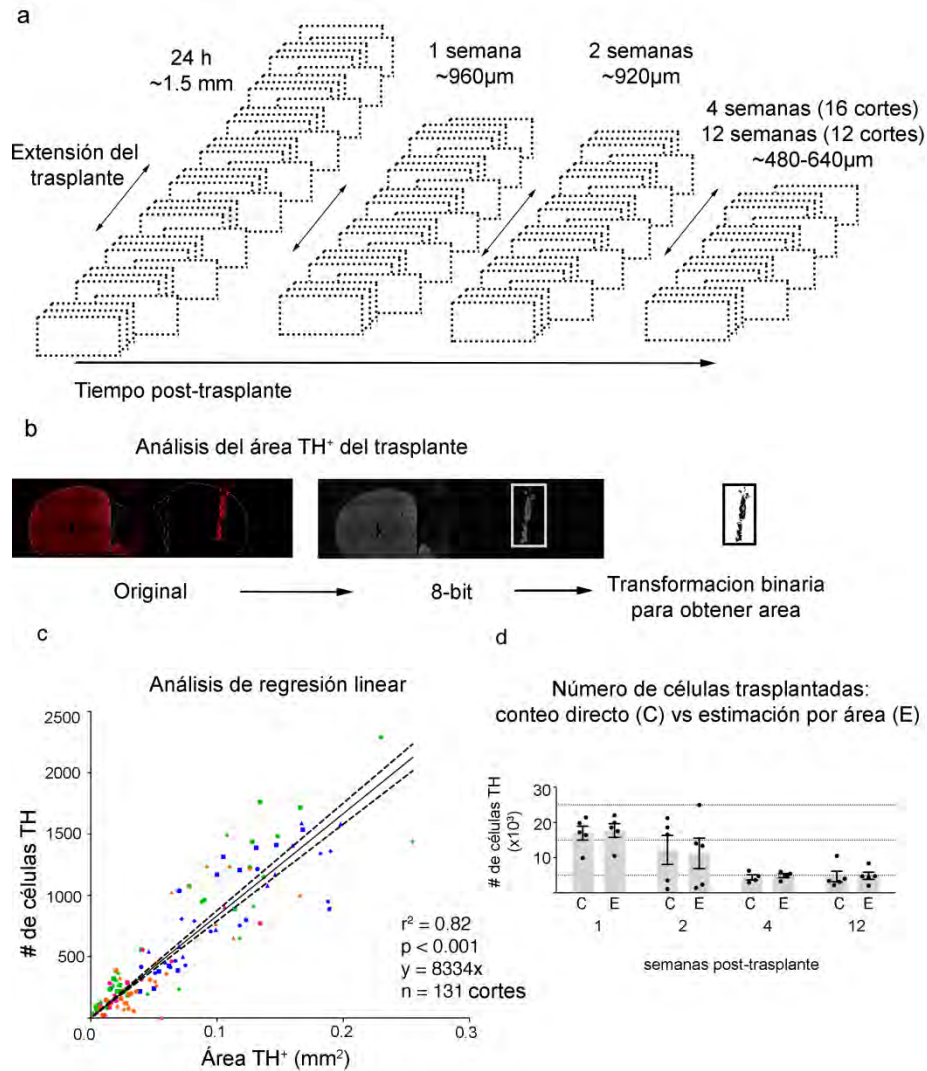
El análisis de las imágenes fue realizado en el software ImageJ. El tamaño pequeño de los trasplantes en los grupos sacrificados 1, 2, 4 y 12 semanas post-trasplante, nos permitió determinar el número de células TH<sup>+</sup> mediante conteo directo en cada serie de cortes coronales. Utilizamos uno de cada cuatro cortes seriados para la cuantificación (Figura 4a). En casos donde el trasplante no era visible o era muy pequeño en el eje antero-posterior, utilizamos dos de cada cuatro cortes para corroborar la presencia del trasplante y de ser necesario todos los cortes recolectados. El número de células TH<sup>+</sup> dentro del trasplante fue manualmente determinado utilizando imágenes en z obtenidas con un objetivo de 40x con

microscopio confocal. Solo las células TH<sup>+</sup> con núcleos visibles y completos fueron utilizadas para su conteo. Los conteos celulares fueron corregidos por el método de Abercrombie (Abercrombie, 1946) como se ha realizado en estudios previos (Björklund *et al.*, 2002; Galan-Rodriguez *et al.*, 2008; Grealish *et al.*, 2010). Estimamos el total de células TH<sup>+</sup> en el trasplante para cada animales extrapolando el número de células TH<sup>+</sup> contadas en cada corte coronal.

Para corroborar que las células TH<sup>+</sup> eran células trasplantadas en vez de células endógenas utilizamos un método independiente a la expresión de TH. En los animales sacrificados a corto plazo (24 h, 1, 2 y 4 semanas post-trasplante), las cromoesferas de 5 días de cultivo fueron cargadas con una molécula fluorescente conocida como CFSE (10 µM, Life Technologies) siguiendo las indicaciones del productor para células en suspensión. Después de 4 días, las cromoesferas-CFSE<sup>+</sup> fueron trasplantadas como se describió anteriormente.

En el grupo sacrificado 24 h post-trasplante la extensión del trasplante era mucho mayor así como la densidad de células encontradas, imposibilitando el conteo directo. Por lo tanto, desarrollamos un método de estimación basado en el área TH<sup>+</sup> del trasplante. Este método consiste en aproximar el número de células basado en la relación lineal obtenida del área TH<sup>+</sup> del trasplante y el número de células TH<sup>+</sup> dentro de dicha área contadas directamente (como se describió anteriormente) (Figura 4c). Obtuvimos el área TH<sup>+</sup> del trasplante utilizando la herramienta para medir áreas del software ImageJ (Figura 4b). Brevemente, se realizaron reconstrucciones del trasplante a una magnificación de 10x. La imagen obtenida fue convertida a imagen de 8-bit y posteriormente a imágenes binarias (Figura 4b), la cual fue utilizada para determinar el área. Se obtuvo una gráfica del área

TH<sup>+</sup> versus el número de células individuales contadas directamente dentro de dichas áreas para cada corte utilizado, la relación encontrada reflejo una buena correlación lineal (Figura 4c ), indicando que el área TH<sup>+</sup> puede ser utilizada para estimar el numero de células en trasplantes grandes donde el conteo individual es impráctico o imposible. Verificamos esto comparando el número de células TH<sup>+</sup> contadas directamente y mediante el método de estimación basado en área (Figura 4d) utilizando la relación lineal obtenida, encontrando que ambos valores son muy cercanos y no difieren estadísticamente.



**Figura 4. Estimación de la sobrevivencia del trasplante de cromoesferas.** (a) 1 de cada 4 cortes coronales del estriado (representados por cuadros punteados) fueron utilizados para la inmunofluorescencia para TH, en algunos casos se utilizó 1 cada 2 o todos los cortes recolectados (ver métodos). La extensión del trasplante en el eje antero-posterior a lo largo del estriado, fue estimado determinando el número de cortes coronales del estriado en los cuales se visualizaba el trasplante. En dichos cortes se determinó el área TH<sup>+</sup> del trasplante y el número de células TH<sup>+</sup> dentro del área. El número de cortes con trasplante disminuye en el eje antero-posterior conforme pasa el tiempo post-trasplante. (b) Para la cuantificación del área TH<sup>+</sup> del trasplante se realizaron reconstrucciones de los cortes procesados con inmunofluorescencia para TH (imagen izquierda) a una magnificación 10x. Esta imagen fue transformada en a una imagen de 8-bits (imagen de en medio) seguido de una transformación binaria (imagen derecha) para poder cuantificar fácilmente el área del trasplante en cada corte usando la función de Image J para cuantificar área. (c) Grafica del área TH<sup>+</sup> estimada *versus* el número de células TH<sup>+</sup> contadas en dicha área. Cada punto representa el número de células dada el área de un solo corte coronal procesado. Los datos para cada tiempo evaluado (1, 2, 4 y 12 semanas post-

trasplante) están representados por diferentes colores. La línea sólida es la regresión lineal de los datos, cuyos parámetros se muestran abajo del lado derecho de la figura. Las líneas punteadas denotan el error del ajuste lineal. **(d)** La comparación entre la estimación (señalada con la letra E en la gráfica) del número de células TH<sup>+</sup> usando la medida del área TH<sup>+</sup> extrapolada a la regresión lineal en (c) con el conteo directo de las células TH<sup>+</sup> (señalada con la letra D en la gráfica) muestra que el método de aproximación arroja resultados muy similares al método de conteo directo, sin diferencia estadística (ANOVA multivariado,  $P < 0.05$ ,  $F = 0.0043$ ,  $p = 0.9480$ ). Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

## Densitometría de las fibras dopaminérgicas

La densidad de las fibras TH<sup>+</sup> en el estriado fue calculada como ha sido descrito previamente (Voutilainen *et al.*, 2009), utilizando de 3 a 4 cortes coronales del estriado de cada animal. Los cortes fueron procesados con inmunohistoquímica para TH. Las imágenes de dichos cortes fueron obtenidas con un microscopio estereoscópico (Leica EZ4D) utilizando iluminación constante y parámetros iguales. Las imágenes digitalizadas fueron analizadas en el programa Image J. Los datos están presentados como valores de densidad óptica (D.O.) para cada hemisferio. En los casos donde la D.O. del estriado lesionado era mayor de lo esperado, se corroboró la muerte celular mediante el conteo directo de los somas de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc.

## Estadística

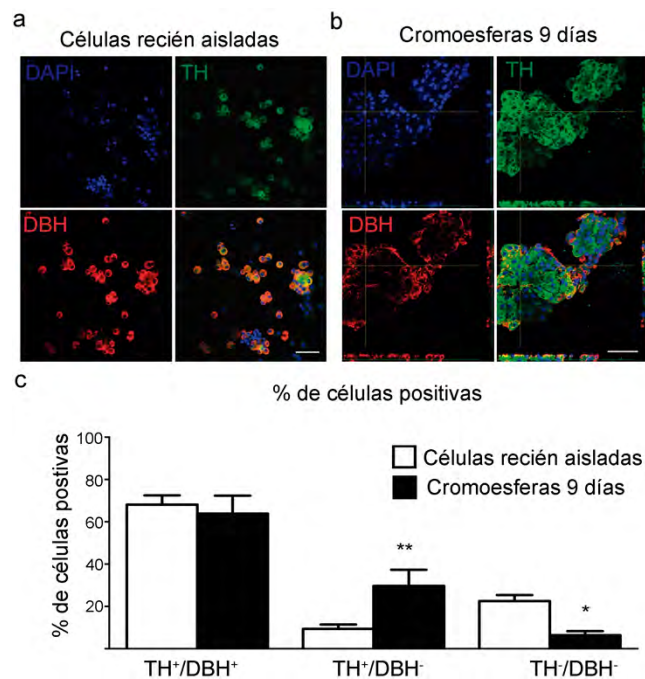
Todos los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Prisma 6 (GraphPad Software, Inc.) especificados en cada pie de figura. Para los datos en porcentaje se realizó la transformación arcoseno para poder realizar estadística paramétrica.

## RESULTADOS

### El cultivo de cromoesferas favorece el fenotipo dopaminérgico

Previo al estudio de los efectos del trasplante de cromoesferas en el modelo de la EP, analizamos algunas características de las cromoesferas en cultivo reportadas previamente (Vukicevic *et al.*, 2012). Una de las características de las cromoesferas importante para el presente estudio es el incremento en el fenotipo dopaminérgico en comparación a las CC. Esto ha sido determinado por otros autores mediante el análisis del RNAm para TH el cual se incrementa en las células de las cromoesferas mientras que disminuye el RNAm para PNMT (enzima limitante en la síntesis de adrenalina) en comparación con CC (Vukicevic *et al.*, 2012). Por lo tanto, decidimos determinar si en nuestras condiciones dicha observación era replicada. Para ello realizamos dobles marcajes para TH (como marcador de células dopaminérgicas) y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH, como marcador de células noradrenérgicas y adrenérgicas) en células recién aisladas (*i.e.* CC post-sembrado diferencial) y en cortes de cromoesferas de 9 días de cultivo (Figura 5a-b). La selección de dichos marcadores esta basada en la vía de síntesis de las catecolaminas: TH es una enzima que hidroxila al aminoácido tirosina transformándolo en dihidroxifenilalanina (DOPA), posteriormente DOPA es transformada en dopamina mediante una enzima decarboxilasa, de ahí la enzima DBH transforma la dopamina en noradrenalina la cual es transformada en adrenalina por acción de una transferasa. Por lo tanto, la presencia simultanea de TH y DBH en la célula indica un fenotipo noradrenérgico/adrenérgico, mientras que la ausencia de DBH indicaría un fenotipo exclusivo dopaminérgico.

De acuerdo a observaciones previas (Chung *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2012; Vukicevic *et al.*, 2012), la formación de cromoesferas se observó a partir del tercer día de cultivo, cuando las células en suspensión comienzan a agregarse formando estructuras esféricas. En las cromoesferas de 9 días de cultivo observamos un incremento significativo del 20% en el número de células con fenotipo dopaminérgico (TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup>) en comparación con células recién aisladas, y una disminución significativa del 16% en el número de células que no expresan ningún marcador (TH<sup>-</sup>/DBH<sup>-</sup>), sin cambio en el número de células que expresan ambos marcadores (TH<sup>+</sup>/DBH<sup>+</sup>) (Figura 5c). Esto sugiere que el cultivo de cromoesferas favorece el fenotipo dopaminérgico mientras que mantiene el fenotipo noradrenérgico/adrenérgico.



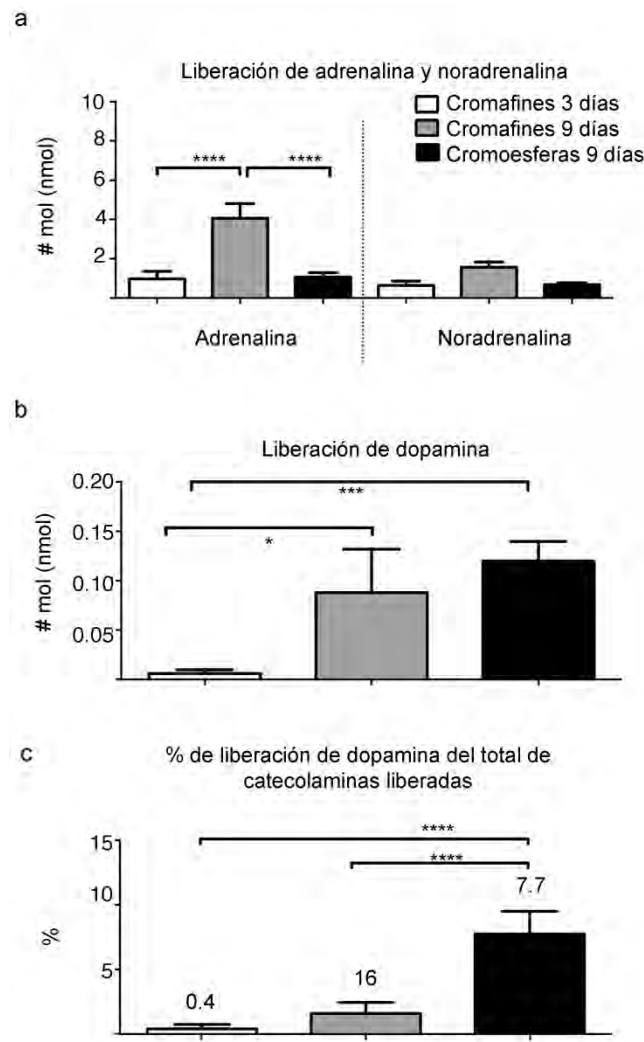
**Figura 5. Análisis *in vitro* del número de células TH<sup>+</sup> en cromoesferas y en CC. (a-b)** Fotografías tomadas en microscopio confocal de muestras procesadas para doble inmunofluorescencia contra TH (verde) y DBH (rojo) en células recién aisladas (a) y en cromoesferas de 9 días de cultivo (b). Los núcleos de todas las células se marcaron con DAPI (azul). Los canales se muestran por separado junto con la imagen superpuesta



de los 3 canales. En las cromoesferas **(b)** se muestran las imágenes ortogonales (xyz). Barra 100  $\mu\text{m}$ . **(c)** Gráfica que muestra el porcentaje de células que expresan TH junto con DBH ( $\text{TH}^+/\text{DBH}^+$ ), solo TH ( $\text{TH}^+/\text{DBH}^-$ ), y células DAPI<sup>+</sup> que no expresan ninguno de los dos marcadores ( $\text{TH}^-/\text{DBH}^-$ ). El porcentaje se obtuvo con base en el número total de núcleos contados. Las barras de error son desviación estándar de la media. Los valores mostrados fueron obtenidos de 3 cultivos independientes con un total de 6 cubreobjetos con células recién aisladas o 3 laminillas con cortes de cromoesferas. Se observó diferencia estadística significativa entre células  $\text{TH}^+/\text{DBH}^-$  en las cromoesferas ( $29.71 \pm 7.635\%$ ) comparado con células recién aisladas ( $9.363 \pm 2.083\%$ ) y entre células  $\text{TH}^-/\text{DBH}^-$  en las cromoesferas ( $6.410 \pm 1.937\%$ ) comparado con células recién aisladas ( $22.50 \pm 2.9\%$ ) (ANOVA multivariado,  $P < 0.05$ ;  $F = 71.21$ ,  $DF = 2$ ,  $p < 0.0001$ , *post-hoc* Bonferroni  $p = 0.0057^{**}$  para  $\text{TH}^+/\text{DBH}^-$  y  $0.0128^*$  para  $\text{TH}^-/\text{DBH}^-$ ). Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

Posteriormente, quisimos determinar si el incremento observado en el número de células  $\text{TH}^+/\text{DBH}^-$  en las cromoesferas tenía efecto a nivel funcional en la liberación de dopamina. Para esto, utilizamos cromoesferas de 9 días y CC de 3 y 9 días de cultivo en las que medimos la cantidad de catecolaminas liberadas basalmente. Las células de cada condición fueron sembradas a una densidad de  $30 \times 10^3$  células por pozo. El medio de cultivo fue cambiado por solución fisiológica (ver métodos) y las células fueron mantenidas por 5 min en completa oscuridad dentro de la incubadora. Pasado ese tiempo, el líquido extracelular fue recolectado y filtrado para ser analizado con HPLC acoplado a un DE. Encontramos que, en las CC la liberación de adrenalina incrementa significativamente (~4 veces) con el tiempo de cultivo sin cambios en la liberación de noradrenalina (Figura 6a). En contraste, el cultivo de cromoesferas mantiene la liberación de estas dos catecolaminas a niveles similares a los observados para CC de 3 días de cultivo, y significativamente menor en el caso de adrenalina en comparación a CC de 9 días de cultivo (Figura 6a). Por otro lado, la liberación basal de dopamina incrementa significativamente (~10 veces) en cromoesferas y en CC de 9 días de cultivo, sin diferencia significativa entre CC de 9 días de cultivo y cromoesferas. Sin embargo, el porcentaje de dopamina liberada del total de

catecolaminas liberadas (dopamina + noradrenalina + adrenalina) es significativamente mayor sólo para cromoesferas (Figura 6c), representando el 7.7% del total de catecolaminas liberadas en comparación al 1.6% y 0.4% de dopamina liberada por CC de 9 y 3 días de cultivo, respectivamente. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el cultivo de cromoesferas favorece el fenotipo dopaminérgico y mantiene los niveles iniciales de fenotipo noradrenérgico y adrenérgico, mientras que las CC favorecen al fenotipo adrenérgico.



**Figura 6. Análisis *in vitro* de la liberación basal de catecolaminas en cromoesferas y CC.** (a-b) La liberación basal de catecolaminas fue determinada por HPLC-DE en CC de 3 y 9 días de cultivo y en

cromoesferas 9 días de cultivo. Las CC de 3 días y las cromoesferas de 9 días de cultivo se obtuvieron de 8 glándulas adrenales procesadas independientemente, mientras que las CC de 9 días de cultivo se obtuvieron de 3 glándulas. El medio extracelular fue recolectado para la cuantificación de catecolaminas liberadas, los valores se expresan en nmol. (a) Se observaron diferencias significativas para adrenalina (CC de 3 y 9 días:  $0.9726 \pm 0.3828$  nmol y  $4.057 \pm 0.7481$  nmo respectivamente; cromoesferas de 9 días:  $1.065 \pm 0.2261$ ; ; ANOVA multivariado,  $P > 0.05$ ,  $F = 17.36$ ,  $DF = 2$ ,  $p < 0.0001$ ; *post-hoc* Tukey,  $p < 0.0001$ \*\*\*\*) y (b) dopamina (CC de 3 días:  $0.0058 \pm 0.0038$  nmol y CC de 9 días:  $0.087 \pm 0.043$  nmol; cromoesferas de 9 días:  $0.12 \pm 0.019$  nmol; ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $F = 12.53$ ,  $r^2 = 0.6103$ ,  $p = 0.0005$ ; *post-hoc* Tukey,  $p = 0.0145^*$  y  $p = 0.0004$ \*\*\*). (c) Porcentaje de dopamina liberada respecto al total de catecolaminas liberadas (dopamina + adrenalina + noradrenalina). Se encontraron diferencias significativas entre cromoesferas comparado con CC de 9 y 3 días de cultivo (ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $F = 27.42$ ,  $r^2 = 0.7231$ ,  $p < 0.0001$ ; *post-hoc* Tukey,  $p < 0.0001$ \*\*\*\*). Las barras de error son desviación estándar de la media. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

## El trasplante de cromoesferas y sus efectos sobre la conducta motora en el modelo de 6-OHDA de la EP

Una de las pruebas conductuales más utilizadas para evaluar la alteración motora en el modelo de 6-OHDA de la EP es la conducta de giro inducida con agonistas dopaminérgicos. Esta prueba evalúa a nivel farmacológico la liberación estimulada de dopamina (inducida por amfetamina) y la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos (al estimular los receptores con apomorfina) provocada por la disminución de dopamina dentro del estriado. La administración de los agonistas produce una conducta de giro estereotipada, contralateral o ipsilateral al hemisferio dañado dependiendo del agonista utilizado. Puesto que la amfetamina estimula la liberación de dopamina, los animales lesionados muestran conducta de giro ipsilateral al hemisferio lesionado. Esto se debe a que en el estriado del hemisferio lesionado no hay terminales dopaminérgicas que puedan liberar el neurotransmisor, al contrario del hemisferio contralateral (intacto) donde se produce la liberación de dopamina. Se espera entonces que las células trasplantadas incrementen la concentración de dopamina (directa o indirectamente) en el hemisferio

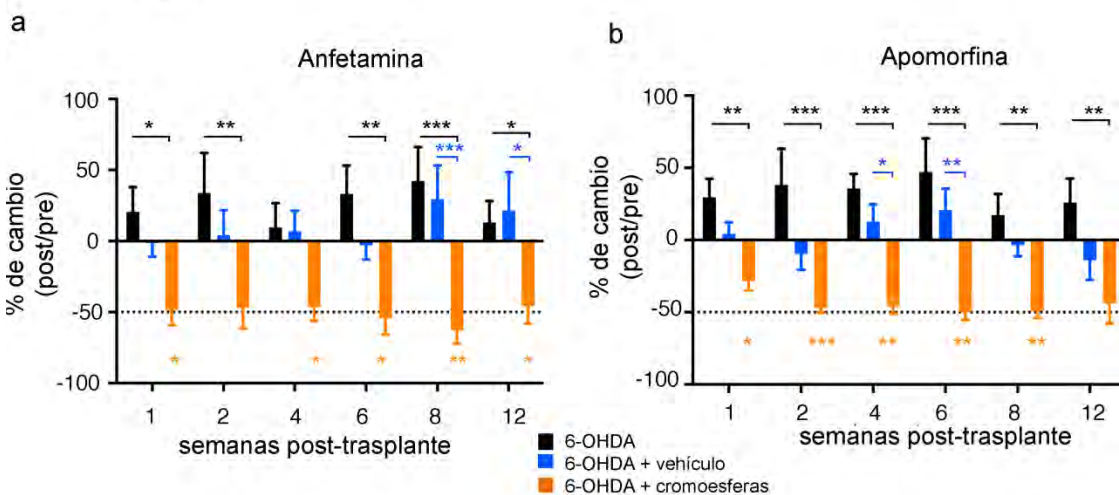
lesionado produzca una disminución en el número de giros. En el caso de apomorfina, se espera que si el trasplante es capaz de liberar dopamina de manera espontánea o inducirla indirectamente, el efecto de hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos dentro del estriado lesionado disminuirá, lo cual se vería reflejado como una disminución del número de giros.

Para determinar si el trasplante de cromoesferas tenía algún efecto sobre la conducta de giro inducida con anfetamina y apomorfina, 18 días después de la lesión con 6-OHDA se trasplantó a un grupo de animales con cromoesferas de 9 días de cultivo. Dichos animales fueron evaluados 1 y 2 semanas después de la lesión con 6-OHDA (*i.e.* evaluaciones basales) y 1, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas después del trasplante de cromoesferas (Figura 7). Los datos mostrados en las gráficas representan el porcentaje de cambio del número de giros con base en el número de giros de cada animal previa al trasplante o tratamiento (basal), por lo que valores mayores a 0% indica un incremento en el número de giros, mientras que valores menores a 0% indican una disminución en el número de giros.

En el caso de anfetamina, el grupo lesionado con 6-OHDA ( $n = 6$ ) mostró conducta estereotipada de giro estable en el tiempo (Figura 7a) mientras que animales de los grupos control ( $n = 6$ ) y sham ( $n = 6$ ) no presentaron conducta de giro. En contraste, 7 de 12 animales trasplantados disminuyeron el número de giros (*i.e.* decremento  $\geq 10\%$ ) durante las dos primeras evaluaciones posteriores al trasplante (Figura 7a), la cual fue significativa respecto a su ejecución previa al trasplante y persistió en algunos casos hasta 3 meses después del trasplante (Figura 7a, asteriscos naranjas). Los 5 animales que no mostraron mejoría durante las primeras dos evaluaciones fueron sacrificados posterior a la segunda evaluación. En estos animales no encontramos rastros de células trasplantadas

sobrevivientes utilizando la técnica de inmunofluorescencia para TH, sugiriendo que la sobrevivencia es un requisito para la mejora motora. Por lo tanto, dichos animales fueron excluidos de los análisis. Considerando sólo aquellos animales que disminuyeron su número de giros  $\geq 10\%$  durante las primeras dos evaluaciones, encontramos que el porcentaje de mayor disminución fue de 63% a las 8 semanas post-trasplante. El promedio de disminución durante los 3 meses de evaluación fue de 51%, con diferencia estadística significativa durante todas las evaluaciones realizadas comparado con el grupo 6-OHDA sin trasplante exceptuando la evaluación realizada 4 semanas post-trasplante (Figura 7a, asteriscos negros). Para verificar si el efecto observado en la conducta de giro era dado por las células trasplantadas, y que la inmunosupresión y/o la administración del vehículo no tenían algún efecto, agregamos un grupo adicional en el cual animales lesionados fueron inmunosuprimidos y administrados con vehículo en vez de cromoesferas (6-OHDA + vehículo, n = 6). Este grupo no mostro ningún cambio en la conducta de giro relativo a su ejecución previa al trasplante y al compararlo con los animales del grupo 6-OHDA (Figura 7a). Sin embargo, si encontramos diferencias significativas en algunas evaluaciones al compararlo con los animales del grupo 6-OHDA + cromoesferas (Figura 7a, asteriscos azules), confirmando que la mejora observada en los animales trasplantados deriva de las cromoesferas trasplantadas.

## Conducta de giro



**Figura 7. Efectos del trasplante de cromoesferas en la prueba de giro inducida con anfetamina y apomorfina en animales lesionados con 6-OHDA.** La conducta de giro inducida con (a) anfetamina y (b) apomorfina fue evaluada en 3 grupos: 6-OHDA (n = 6 para anfetamina y n = 6 para apomorfina, negro), 6-OHDA+vehículo (n = 6 para anfetamina y n = 6 para apomorfina, azules), 6-OHDA+cromoesferas (n = 7 para anfetamina y n = 6 para apomorfina, naranjas). En todos los grupos, el número de giros registrados durante las dos evaluaciones realizadas después de la lesión con 6-OHDA previas al comienzo del experimento (7 y 14 días post-lesión) fueron utilizados para obtener el porcentaje de cambio en las evaluaciones realizadas post-cirugía (comenzando 7 días después del trasplante o administración de vehículo). Cada barra es la media  $\pm$  la desviación estándar. La línea punteada señala la disminución equivalente a 50%. Se observaron diferencias estadísticas significativas entre el número de giros antes y después del trasplante (asteriscos naranjas) inducidos con anfetamina (ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 7.086$ ,  $DF = 6$ ,  $r^2 = 0.5415$ ,  $p = 0.0035$ ; *post-hoc* Dunnett,  $p < 0.05^*$  y  $p < 0.01^{**}$ ) y con apomorfina (ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 9.03$ ,  $DF = 6$ ,  $r^2 = 0.569$ ,  $p = 0.0128$ ; *post-hoc* Dunnett,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  y  $p < 0.001^{***}$ ). Además, el cambio en el número de giros en el grupo con trasplante fue significativamente mayor que en el grupo lesionado sin trasplante (asteriscos negros) y en el grupo vehículo (asteriscos azules) para anfetamina (ANOVA multivariado,  $P < 0.05$ ,  $F = 6.991$ ,  $DF = 23$ ,  $p < 0.0001$ ; *post-hoc* Tukey,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  y  $p < 0.001^{***}$ ) y apomorfina (ANOVA multivariado,  $P < 0.05$ ,  $F = 10.36$ ,  $DF = 2$ ,  $p = 0.0017$ ; *post-hoc* Tukey,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  y  $p < 0.001^{***}$ ). Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

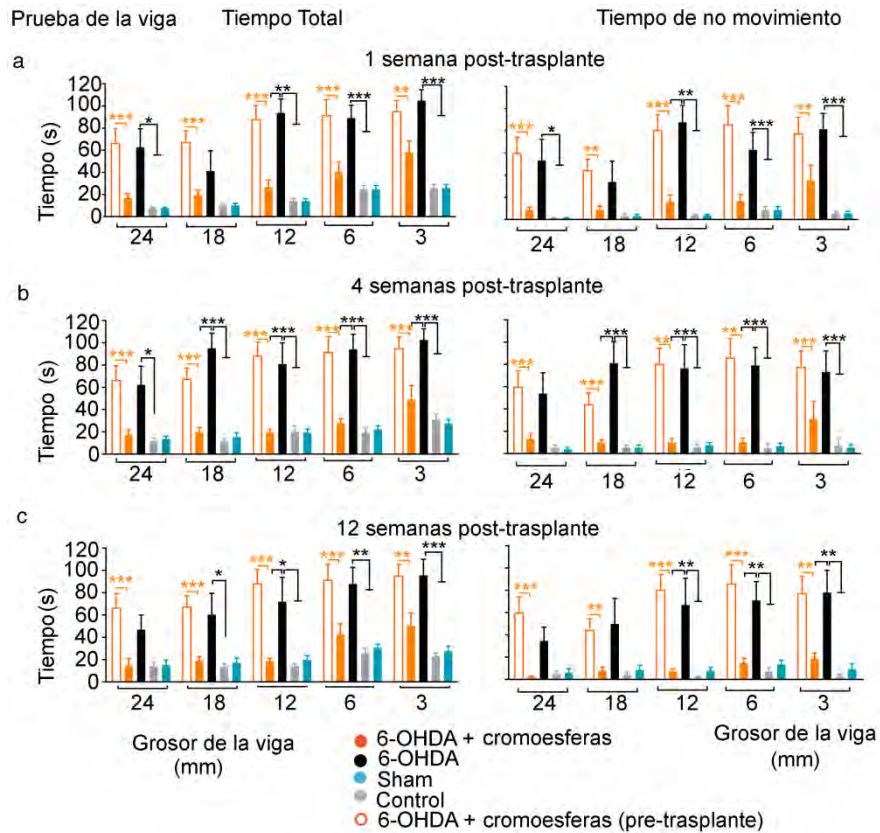
En el caso de la conducta de giro inducida con apomorfina encontramos que 6 de 10 animales trasplantados disminuyeron su conducta de giro  $\geq 10\%$  durante las dos primeras evaluaciones, comparado con su número inicial de giros previo al trasplante (Figura 7b). Los animales sin mejora durante ese tiempo fueron sacrificados y sus cerebros procesados

para determinar la viabilidad del trasplante, y en todos los casos no encontramos sobrevivencia de células TH<sup>+</sup> trasplantadas. En el resto de los animales trasplantados, la disminución en el número de giros persistió hasta por 3 meses (Figura 7b, asteriscos naranjas). Cabe señalar que un animal fue sacrificado a las 4 semanas post-trasplante debido a una infección en el oído. El porcentaje de mayor disminución en el número de giros fue de 50% a las 6 semanas post-trasplante. El promedio de disminución durante los 3 meses de evaluación fue de 41% y encontramos diferencias estadísticas significativas durante casi todas las evaluaciones realizadas comparado con el grupo sin trasplante (Figura 7b, asteriscos negros). Además, el grupo 6-OHDA + vehículo (n = 6) no mostró cambio en la conducta de giro relativo a su ejecución previa al trasplante o comparado con los animales del grupo 6-OHDA (Figura 7b), mientras que en algunas evaluaciones fue significativamente mayor al compararlo con los animales con trasplante (Figura 7b, asteriscos azules).

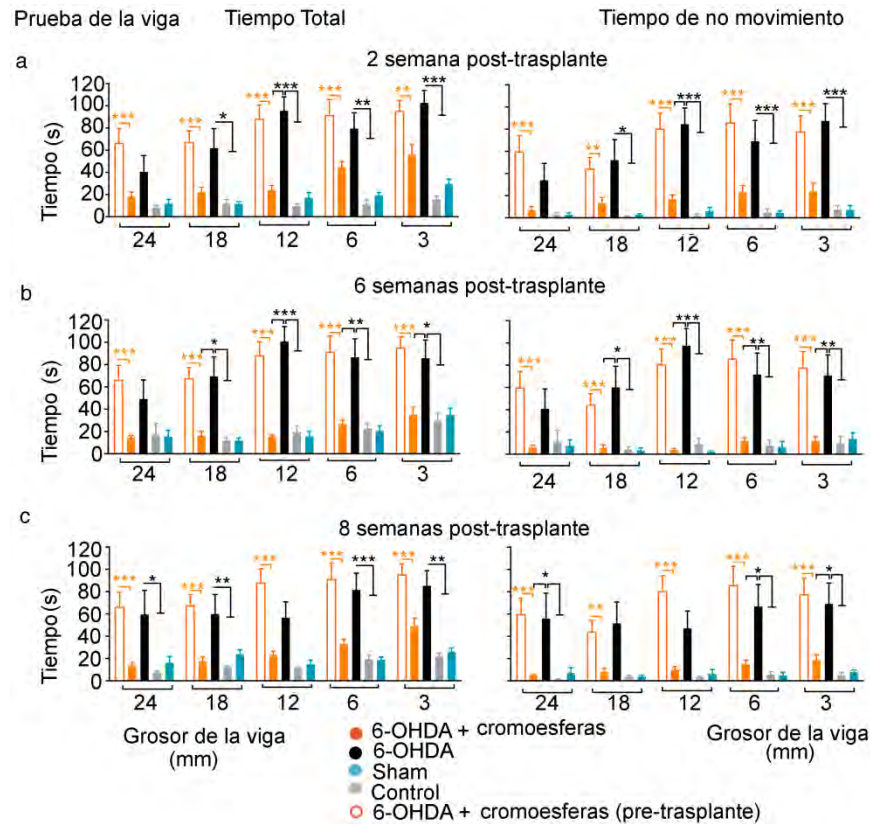
Hasta ahora, corroboramos los efectos del trasplante de cromoesferas (cuando sobrevive) sobre la asimetría motora evaluada con pruebas farmacológicas. Sin embargo, queríamos determinar los efectos del trasplante sobre la conducta motora evaluada sin el uso de fármacos. Para esto se utilizó la prueba de la viga, la cual mide coordinación motora mediante la evaluación del tiempo que le toma al animal subir sobre una viga inclinada de distintos grosores (24, 18, 12, 6 y 3 mm), donde el incremento en el tiempo denota menor coordinación (Drucker et al., 1991). La disminución en la coordinación motriz también se ve reflejada en la prueba mediante el incremento del tiempo en el que el animal permanece inmóvil (*i.e.* tiempo de no movimiento) (Drucker-Colín et al., 1991). Durante las primeras dos semanas post-trasplante, observamos una disminución del tiempo total en 8 de 11

animales trasplantados, relativo al tiempo previo al trasplante y posterior a la lesión (Figura 8a y 9a). Los 3 animales sin mejora fueron sacrificados y encontramos nuevamente que no había rastro de sobrevivencia de células TH<sup>+</sup> trasplantadas. Para el resto de los tiempos analizados fueron incluidos los 8 animales que habían disminuido el tiempo total durante las dos primeras evaluaciones, y observamos una disminución significativa en el tiempo total en el grupo de 6-OHDA + cromoesferas (n = 8) comparado con su ejecución previa al trasplante (Figura 8 y 9, asteriscos naranjas) y no encontramos diferencias en comparación con los grupos control y sham. El grupo 6-OHDA mostró mayor dificultad al realizar la tarea durante los 3 meses de evaluación (Figura 8 y 9). La reducción clara en el tiempo total y de no movimiento observada en el grupo con trasplante fue significativamente menor en algunas evaluaciones al compararlo con el grupo 6-OHDA sin trasplante (n = 7) (Figura 8 y 9, asteriscos negros).





**Figura 8. Efecto del trasplante de cromoesferas sobre la ejecución motora durante la prueba de la viga 1, 4 y 12 semanas después del trasplante.** (a-c, izquierdo) El tiempo total (segundos) que les toma a los animales en completar la tarea y (a-c, derecho) el tiempo en el que los animales permanecen inmóviles (tiempo de no movimiento) mientras hacen la prueba, fueron evaluados en cuatro grupos. Se evaluó la ejecución de cada animal para todos los grosores de las vigas (3, 6, 12, 18 y 24 mm). Los grupos incluidos en el experimento fueron los siguientes: control (n = 8, gris), Sham (n = 8 azul), 6-OHDA (n = 7, negro), 6-OHDA + cromoesferas (n = 8, naranja). Las evaluaciones en todos los grupos fueron realizadas periódicamente durante 3 meses después del trasplante en el grupo experimental, tiempos utilizados como referencia para el resto de los grupos. Solo se muestran en las gráficas las evaluaciones realizadas 1, 4 y 12 semanas post-trasplante. Las barras naranja sin relleno son la media de los animales con trasplante obtenidos después de la lesión con 6-OHDA y previo al trasplante de cromoesferas. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el tiempo total y el tiempo de no movimiento al comparar los valores pre y post trasplante (asteriscos naranjas) (ANOVA multivariado,  $p < 0.05$ ,  $F = 5.349$ ,  $DF = 4$ ,  $p = 0.0018$ ; *post-hoc* Bonferroni,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Además, se encontró diferencias significativas en el tiempo total y tiempo de no movimiento entre el grupo 6-OHDA comparado con el grupo con trasplante, control y sham (asteriscos negros) (ANOVA multivariado,  $P < 0.05$ ,  $F = 36.17$ ,  $DF = 7$ ,  $< 0.0001$ ; *post-hoc* Bonferroni,  $p < 0.05^{*}$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Las barras de error son desviación estándar de la media. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.



**Figura 9. Efecto del trasplante de cromoesferas sobre la ejecución motora durante la prueba de la viga 2, 6 y 8 semanas después del trasplante.** (a-c, izquierdo) El tiempo total (segundos) que les toma a los animales en completar la tarea y (a-c, derecho) el tiempo en el que los animales permanecen inmóviles (tiempo de no movimiento) mientras hacen la prueba, fueron evaluados en cuatro grupos. Se evaluó la ejecución de cada animal para todos los grosores de las vigas (3, 6, 12, 18 y 24 mm). Los grupos incluidos en el experimento fueron los siguientes: control (n = 8, gris), Sham (n = 8 azul), 6-OHDA (n = 7, negro), 6-OHDA + cromoesferas (n = 8, naranja). Las evaluaciones en todos los grupos fueron realizadas periódicamente durante 3 meses después del trasplante en el grupo experimental, tiempos utilizados como referencia para el resto de los grupos. Solo se muestran en las gráficas las evaluaciones realizadas 2, 6 y 8 semanas post-trasplante. Las barras naranja sin relleno son la media de los animales con trasplante obtenidos después de la lesión con 6-OHDA y previo al trasplante de cromoesferas. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el tiempo total y el tiempo de no movimiento al comparar los valores pre y post trasplante (asteriscos naranjas) (ANOVA multivariado,  $p < 0.05$ ,  $F = 5.349$ ,  $DF = 4$ ,  $p = 0.0018$ ; *post-hoc* Bonferroni,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Además, se encontró diferencias significativas en el tiempo total y tiempo de no movimiento entre el grupo 6-OHDA comparado con el grupo con trasplante, control y sham (asteriscos negros) (ANOVA multivariado,  $P < 0.05$ ,  $F = 36.17$ ,  $DF = 7$ ,  $< 0.0001$ ; *post-hoc* Bonferroni,  $p < 0.05^{*}$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Las barras de error son desviación estándar de la media. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

En las tres pruebas conductuales encontramos que en los animales que no mostraron mejoría durante las dos primeras evaluaciones (criterio de exclusión) tampoco tenían niveles importantes de trasplante sobreviviente. Para validar la hipótesis de que el trasplante era responsable de los efectos conductuales observados en los animales incluidos en los experimentos, realizamos análisis histológico en todos los animales para corroborar el grado de denervación dopaminérgica estriatal provocado por la neurotoxina 6-OHDA y determinar la sobrevivencia del trasplante a las 12 semanas post-trasplante. El análisis mostró que en las tres pruebas conductuales realizadas, aquellos animales con mejora robusta y consistente tenían células TH<sup>+</sup> trasplantadas sobrevivientes (ver Tabla 1, panel superior, como resumen de las pruebas conductuales junto con los porcentajes de mejora motora y grado de sobrevivencia para todos los animales experimentales utilizados para evaluar conducta).

**Tabla 1. Eficacia de mejora motora y sobrevivencia del trasplante de cromoesferas.**

Experimento	No. de animales al principio del experimento (A)	No. de animales con mejora motora durante las primeras dos semanas (B)	% de eficacia motora ([B x 100] / A)	No. de animales con trasplante al final del experimento (C)	% de eficacia de sobrevivencia ([C x 100] / A)
1. Conducta de giro	12 y 10	7 y 6	59	5 y 3	36
2. Prueba de la viga	11	8	73	6	55
<b>Total (1 y 2)</b>	33	21	77	14	42
3. Relación de sobrevivencia y mejora motora	13	6	46	8	62
<b>Total (1-3)</b>	46	27	59	22	47

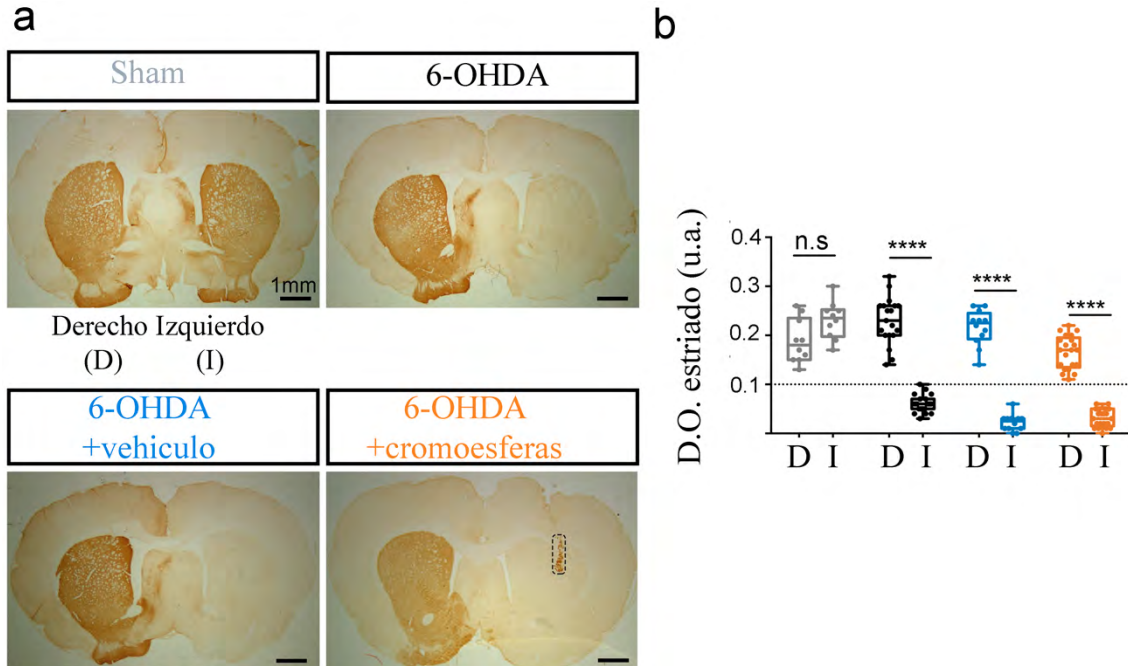
La tabla 1 es un resumen de la eficacia motora y de sobrevivencia del trasplante de cromoesferas. Los datos fueron obtenidos a partir de todos los experimentos realizados en donde se evaluó la conducta motora. El porcentaje de eficacia motora  $([B \times 100] / A)$  se calculó a partir del número de animales con mejora motora durante la primera o segunda semana post-trasplante (B) del total de animales trasplantados originalmente (A). El porcentaje de eficacia de sobrevivencia  $([C \times 100] / A)$  se calculó a partir del número de animales con

presencia de células trasplantadas al final del experimento (C) del total de animales trasplantados originalmente (A). Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

Los resultados observados en las pruebas conductuales sugieren que el trasplante de cromoesferas sobreviviente disminuye las alteraciones motoras observadas en el modelo de 6-OHDA de la EP. Sin embargo, la mejora observada podría ser también resultado de una lesión parcial de la vía dopaminérgica nigro-estriatal. Para descartar esto, realizamos inmuno-histoquímica para TH en cortes coronales del estriado de todos los animales utilizados y determinamos la densidad óptica (D.O.) de las fibras TH<sup>+</sup> estriatales endógenas en ambos hemisferios. En el caso de los animales trasplantados, se excluyó la zona TH<sup>+</sup> que contenía al trasplante para el análisis (Figura 10a). Encontramos que el grado de denervación dopaminérgica es similar en todos los animales tratados con 6-OHDA, correspondiente a un grado de lesión severo (Figura 10) y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Por lo tanto, la mejora observada en las pruebas conductuales es consecuencia del trasplante sobreviviente más que a una diferencia en el grado de lesión. Además, no observamos en ningún animal con trasplante presencia de marcaje para TH fuera del sitio del trasplante, lo que sugiere que no hay inervación proveniente de las células trasplantadas y que tampoco inducen una recuperación de las fibras endógenas por mecanismos neuro-protectores, como ha sido observado en otros estudios al trasplantar CC (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005).

En conjunto, nuestros resultados muestran que el trasplante de cromoesferas sobreviviente mejora las alteraciones motoras presentes en el modelo de 6-OHDA de la EP, probablemente por la liberación de dopamina u otras moléculas (*e.g.* noradrenalina y

adrenalina) que activan receptores dopaminérgicos, tanto en condiciones basales como por estimulación farmacológica.



**Fig 11. Densidad de fibras dopaminérgicas endógenas en el estriado de todos los animales evaluados conductualmente.** El grado de denervación dopaminérgica en el estriado fue medido para corroborar la efectividad de la lesión con la neurotoxina 6-OHDA (a) Fotografías representativas de inmuno-histoquímica para TH en secciones coronales del estriado obtenidas con microscopio estereoscópico en los grupos experimentales y controles señalados en la imagen. (b) Densidad óptica (D.O.) de la señal TH en ambos hemisferios examinada a partir de tres cortes coronales del estriado de cada animal en todos los grupos utilizados descritos hasta ahora (*i.e.* aquellos evaluados hasta 12 semanas). Los datos de la gráfica corresponden a los siguientes grupos: Sham (n = 10 seleccionados al azar, puntos grises), 6-OHDA (n = 19, puntos negros), 6-OHDA + vehículo (n = 12, puntos azules), 6-OHDA + cromoesferas (n = 21, puntos naranja). En los animales con trasplante de cromoesferas, se excluyó el área TH<sup>+</sup> correspondiente al trasplante (a, señalado en la fotografía por un cuadro punteado) para el análisis de densidad óptica. D: hemisferio derecho; I: hemisferio izquierdo. Se observaron diferencias significativas sólo al comparar el hemisferio lesionado (I) versus el hemisferio no lesionado (D) para cada grupo lesionado con 6-OHDA (ANOVA multivareada,  $P < 0.05$ ,  $F = 27.89$ ,  $DF = 6$ ,  $p < 0.0001$ ; *post-hoc* Tukey,  $P < 0.001$ \*\*\*\*). Barras de error denotan la desviación estándar de la media. Barra de escala es 1mm. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

## Sobrevivencia del trasplante de cromoesferas en el modelo de 6-OHDA de la EP

Dada la variabilidad en la supervivencia de las células trasplantadas observada en los experimentos previos, quisimos determinar mediante cuantificación directa la capacidad de supervivencia de las cromoesferas trasplantadas a distintos tiempos. El método previo para determinar la supervivencia del trasplante utilizaba la expresión de TH, puesto que la mayor proporción de las células trasplantadas expresan el marcador (> 90%). Sin embargo, queríamos corroborar que la señal observada proviniera de las células trasplantada utilizando un método independiente a TH. Al igual que en los experimentos previos, se lesionaron animales con 6-OHDA y posteriormente se trasplantaron con cromoesferas previamente marcadas con un marcador fluorescente (CFSE) (n = 26, Figura 11a-b). El trasplante de cromoesferas fluorescentes (CFSE<sup>+</sup>) nos permitió corroborar que el marcaje TH provenía de células trasplantadas, puesto que ambos marcadores (CFSE y TH) se encontraban en la misma región consistente con el sitio del trasplante (Figura 11b). Esto nos permitió validar como método de cuantificación la expresión TH en las células trasplantadas a distintos tiempos: 1, 2 y 4 semanas post-trasplante (para la evaluación a corto plazo). También incluimos 5 animales seleccionados al azar (de aquellos con células supervivientes) de los animales utilizados en los experimentos previos evaluados conductualmente durante 12 semanas post-trasplante.

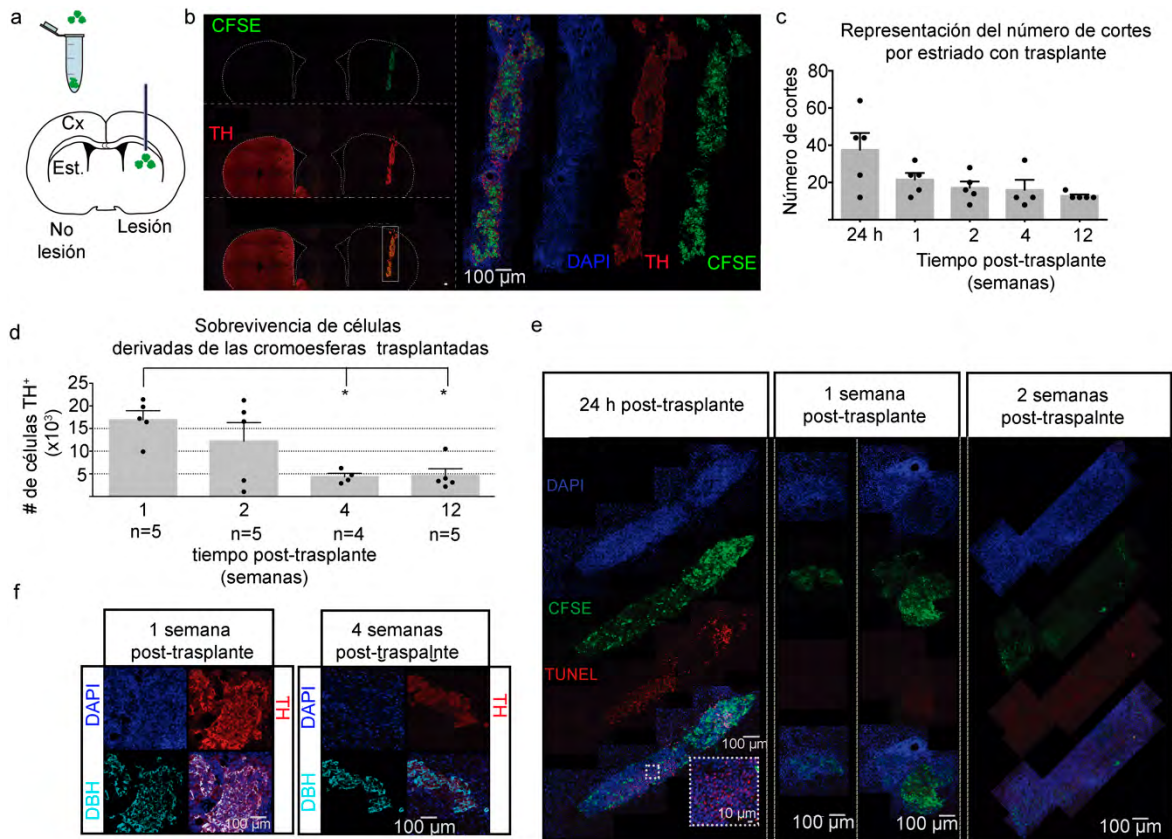
Del total de animales trasplantados (n = 26) solo 19 tuvieron células CFSE<sup>+</sup> o TH<sup>+</sup> en la zona del trasplante (Tabla 2, panel superior) y fueron utilizados para las siguientes cuantificaciones. En cortes seriados, dependiendo del tiempo de evaluación, se encontró que el trasplante de cromoesferas se extendía a través de 8 a 64 cortes (Figura 11c) del

estriado, lo cual es equivalente a 0.6 - 1.5 mm del estriado. La presencia de células TH<sup>+</sup> se observó solo en la zona del trasplante, y ningún proceso o proyección fue observado fuera de la región. Además, contrario a lo que observamos *in vitro* donde 26% de las células analizadas tenían fenotipo dopaminérgico (TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup>), aquí casi todas las células TH<sup>+</sup> co-expresaban DBH (Figura 11f), sugiriendo un fenotipo predominantemente adrenérgico/noradrenérgico.

**Tabla 2. Eficacia de sobrevivencia del trasplante de cromoesferas**

Experimento	No. de animales al inicio del experimento (A)	No. de animales con trasplante al final del experimento (B)	% de eficacia de sobrevivencia ([B x 100] / A)	Disminución de células TH <sup>+</sup> trasplantadas respecto al número de células inicialmente trasplantadas (%)
<b>Sobrevivencia</b>				
24 h	6	5	83	84
1 semana	7	5	71	94.3
2 semanas	7	5	71	95.9
4 semanas	6	4	67	98.5
<b>Total</b>	26	19	73	
<b>Conducta motora (conducta de giro y prueba de la viga)<sup>a</sup></b>				
12 semanas	33	14	42	98.5
<b>Relación de sobrevivencia y mejora motora<sup>a</sup></b>				
4 semanas	13	8	62	
<b>Total final</b>	72	41	57	

La tabla 2 es un resumen de la eficacia de sobrevivencia del trasplante de cromoesferas obtenida a partir de todos los experimentos realizados. El porcentaje de eficacia de sobrevivencia ([B x 100] / A) se calculó a partir del número de animales con presencia de células trasplantadas al final del experimento (B) del total de animales trasplantados originalmente (A). El porcentaje de decremento de células TH<sup>+</sup> trasplantadas fue determinado solo para aquellos animales del panel superior y de en medio. Utilizamos el número inicial de células trasplantadas ( $3 \times 10^5$ ) para calcular la disminución de células sobrevivientes a las 1, 2, 4 y 12 semanas post-trasplante. <sup>a</sup> Estos datos derivan de animales usados para pruebas conductuales (Tabla 1). Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.



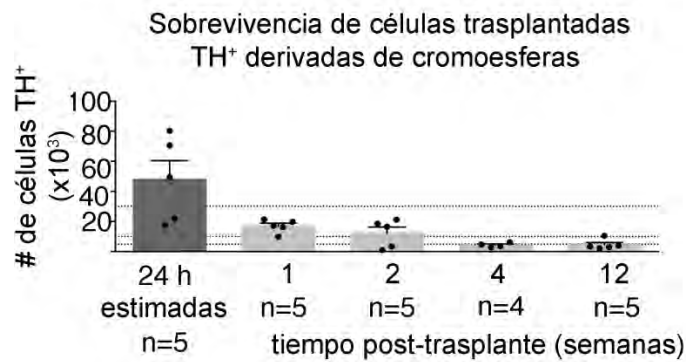
**Figura 11. Supervivencia de cromoesferas trasplantadas en el estriado de animales lesionados con 6-OHDA.** (a) Representación esquemática del sitio de trasplante. Las cromoesferas fueron marcadas en cultivo con CFSE e inyectadas mediante cirugía estereotáxica en el estriado lesionado. Estriado (Str), Corteza (Cx). (b, panel izquierdo) Reconstrucción representativa de una sección coronal del estriado de un animal lesionado con 6-OHDA con trasplante de cromoesferas posterior a la inmunofluorescencia para TH (rojo). Se muestran ambos hemisferios, lesionado (izquierdo) y no lesionado (derecho). El panel de arriba muestra la fluorescencia de CFSE (verde), el panel de en medio muestra la fluorescencia para TH (rojo) y el panel de abajo muestra la sobre-posición de ambas imágenes. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epi-fluorescencia con un objetivo de 10x. La reconstrucción se realizó automáticamente con una platina automatizada. Barra de escala es 100  $\mu\text{m}$ . (b, panel derecho) Reconstrucción representativa a una magnificación mayor (40x) con microscopio confocal del trasplante de cromoesferas del mismo corte de la imagen izquierda. La reconstrucción fue hecha manualmente. DAPI (azul), TH (rojo), CFSE (verde) se muestran en canales separados junto con la sobre-posición de los tres canales. (c) El número de cortes coronales del estriado donde se encontró trasplante para cada animal disminuye durante las primeras 24 h post-trasplante. Se recolectaron cortes coronales del estriado de 40  $\mu\text{m}$  en orden seriado, en general se procesaron uno de cada cuatro cortes para la inmunofluorescencia para TH. Los tiempos analizados fueron 24



h, 1, 2, 12 semanas post-trasplante (n = 5 en cada grupo); 4 semanas post-trasplante (n = 4). **(d)** Se cuantifico la sobrevivencia de las células trasplantadas TH<sup>+</sup> manualmente de imágenes obtenidas con un objetivo de 40x en los grupos sacrificados 1, 2, 4 y 12 semanas post-trasplante (valores obtenidos: 16 955 ± 1 978, 12 195 ± 4 129, 4 391 ± 729, 4 639 ± 1 497, respectivamente). Se observaron diferencias estadísticas significativas indicadas con asteriscos (ANOVA, P > 0.05, F = 5.685, r<sup>2</sup> = 0.5321, p = 0.0083; *post-hoc* Tukey, P < 0.05\*). **(e)** Reconstrucción representativa con microscopia confocal mostrando células marcadas con TUNEL (rojo), marcador de apoptosis, en cortes coronales de animales trasplantados y sacrificados 24 h, 1 y 2 semanas post-trasplante. Las células trasplantadas se observan en verde mediante la presencia del marcador CFSE, y DAPI es mostrado en azul. El panel de abajo muestra la sobre-posición de los canales. Todas las imágenes fueron adquiridas bajo los mismos parámetros a una magnificación de 40x. Las reconstrucciones del área del trasplante se realizaron como se describe en **(b)**. El cuadro punteado insertado muestra una magnificación a 63x de la sección señalada a una menor magnificación. **(f)** Imagen representativa de la doble inmunofluorescencia para TH (rojo) y DBH (cian) en cortes coronales del estriado de dos animales trasplantados y sacrificados 1 y 4 semanas post-trasplante. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

El número total de células TH<sup>+</sup> fue significativamente menor sólo a las 4 y 12 semanas post-trasplante comparado con la primer semana post-trasplante (Figura 11d). Sin embargo, los datos muestran que el porcentaje de disminución de células TH<sup>+</sup> entre la primer y segunda semanas post-trasplante fue de 29%, seguido de una disminución de 64% entre la segunda y cuarta semanas post-trasplante. Además, no observamos pérdida entre la cuarta y la doceava semanas post-trasplante. Estos datos sugieren que la muerte celular es más prominente durante las primeras semanas post-trasplante, por lo que agregamos un grupo adicional para estimar el número de células TH<sup>+</sup> 24 h después del trasplante. En este ultimo grupo el número de células TH<sup>+</sup> 24h post-trasplante estimado fue de 48 ± 12 x10<sup>3</sup> (Figura 12), siendo mucho mayor que el resto de los tiempos analizados, inclusive mayor a lo encontrado 1 semana post-trasplante. Estos datos sugieren que el mayor decremento de células TH<sup>+</sup> trasplantadas ocurre durante las primeras 24 h, equivalente a una disminución del 84% comparado con el número de células trasplantadas inicialmente (3 x 10<sup>5</sup>) (Tabla 2,

panel superior). Finalmente, corroboramos que la muerte de las células trasplantadas es también mas prominente durante la primer semana post-trasplante, utilizando TUNEL como marcador de apoptosis en los grupos sacrificados 24 h, 1 y 2 semanas post-trasplante, encontrando marcaje prominente en el grupo de 24 h comparado con el resto de los tiempos analizados (Figura 11e).

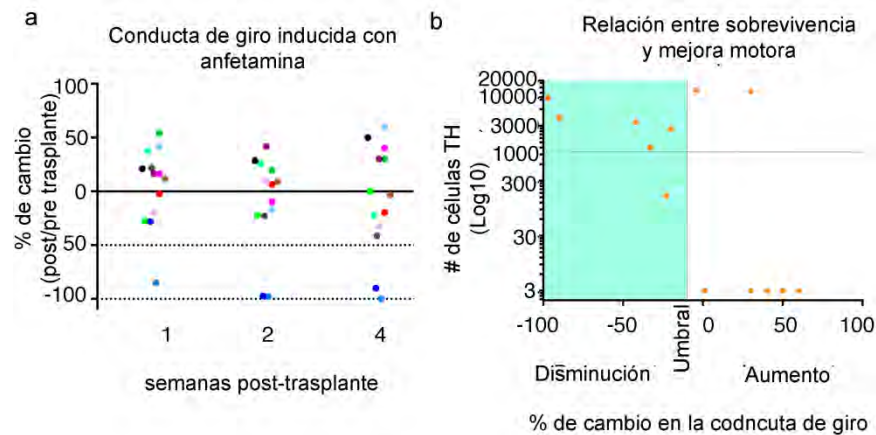


**Figura 12. Sobrevivencia del trasplante de cromoesferas 24 h post-trasplante.** Se cuantifico la sobrevivencia de las células trasplantadas TH<sup>+</sup> manualmente de imágenes obtenidas con un objetivo de 40x en los grupos sacrificados 1, 2, 4 y 12 semanas post-trasplante. En el grupo de 24h post-trasplante se estimó el número de células a partir del área TH<sup>+</sup> cuantificada (ver métodos). Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

## Relación entre la sobrevivencia de las cromoesferas y la disminución en la conducta de giro

Nuestros datos derivados de las pruebas conductuales muestran que la sobrevivencia del trasplante dentro de las primeras semanas es determinante para observar una mejora motora. Sin embargo, dado que nuestro protocolo utilizaba un criterio de exclusión para los experimentos antes descritos, no es posible comparar directamente la relación entre la sobrevivencia y la mejora motora durante un periodo de tiempo mayor y determinado independiente a la existencia de mejora motora durante las primeras dos semanas post-trasplante. Por lo tanto, para determinar directamente la relación entre la sobrevivencia y la mejora motora durante un periodo mayor a dos semanas post-trasplante, trasplantamos a un grupo independiente de animales lesionados y determinamos el cambio en el número de giros inducido con anfetamina a 1, 2 y 4 semanas post-trasplante. Al final del experimento (4 semanas post-trasplante) los animales fueron sacrificados para determinar la sobrevivencia de las células TH<sup>+</sup> y correlacionarla con los datos de la última prueba conductual. A la semana 1 y 2 post-trasplante, 6 de los 13 animales disminuyeron su número de giros  $\geq 10\%$  comparado con su número de giros previo al trasplante (Figura 13a). Solo 4 de esos animales mantuvieron la disminución hasta la semana 4. Dos animales adicionales mostraron mejoría durante la última evaluación (4 semanas post-trasplante) (Figura 13a). Por lo tanto, un total de 6 animales mostraron disminución en el número de giros al final del experimento, de los cuales 4 animales tenían un alto número de células TH<sup>+</sup> sobrevivientes, equivalente a  $2.6$  a  $9.5 \times 10^3$  células TH<sup>+</sup>, mientras que los otros dos animales sólo tenían 1208 y 160 células sobrevivientes (Figura 13b). Por otro lado, encontramos que en 5 de los 7 animales que no mostraron disminución en el número de

giros, tenían nula sobrevivencia de células trasplantadas (Figura 13b), consistente con nuestras observaciones previas (Tabla 1). Sin embargo, es importante mencionar que en dos animales que no disminuyeron su número de giros encontramos una sobrevivencia por arriba de  $12 \times 10^3$  células TH<sup>+</sup>, niveles comparables a los observados en animales con disminución de giros robusta y consistente (Figura 13b). Esta observación sugiere que la sobrevivencia de las células trasplantadas no es el único factor importante para inducir la mejora conductual.



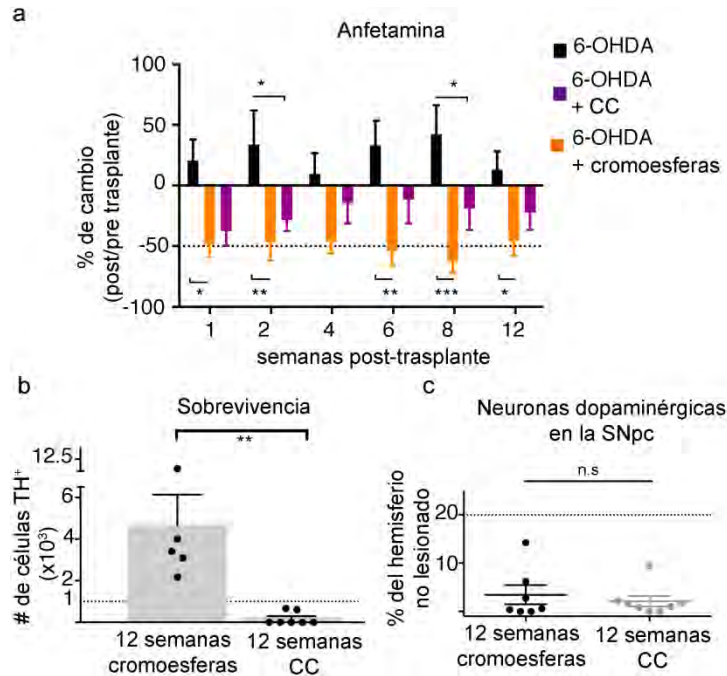
**Figura 13. Relación entre sobrevivencia de las células trasplantadas y la disminución en la conducta de giro.** La conducta de giro inducida con anfetamina se evaluó en animales trasplantados con cromoesferas, para determinar si había una relación entre la sobrevivencia del trasplante y la disminución en el número de giros. (a) Porcentaje de cambio en la conducta de giro inducida con anfetamina en animales lesionados con 6-OHDA con trasplante de cromoesferas. Cada animal esta representado por un color distinto. El porcentaje de cambio fue obtenido del número inicial de giros de cada animal antes del trasplante, por lo que valores negativos indican que el número de giros disminuyó, mientras que valores positivos indican que el número de giros aumentó. La línea punteada señala una reducción en el número de giros del 50%. Al final del experimento (4 semanas post-trasplante), 6 de 13 animales disminuyeron su número de giros  $\geq 10\%$ . Los animales fueron sacrificados después de la última evaluación y se determinó la sobrevivencia de las células trasplantadas en cada uno, mediante conteo directo. El cuadro punteado señala los valores utilizados para la relación con el número de células sobrevivientes trasplantadas. (b) Relación entre el porcentaje de cambio en el número de giros a las 4 semanas post-trasplante relativo al número de giros previo al trasplante (eje x) y el número de células trasplantadas TH<sup>+</sup> que sobrevivieron (eje y) en los animales utilizados en la prueba

conductual en (a). Cada punto representa un solo animal. La relación obtenida muestra que todos los animales con disminución en el número de giros tenían células trasplantadas sobrevivientes. Además los animales sin mejora motora no tuvieron células trasplantadas, con excepción de 2 animales que mostraron un número alto de células que sobrevivieron pero sin cambio o disminución en la conducta de giro. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

## Comparación del trasplante de cromoesferas y el trasplante de CC en el modelo de 6-OHDA de la EP

Hasta ahora, hemos mostrado que en algunos animales el trasplante de cromoesferas sobrevive y que produce efectos funcionales sobre la conducta motora en el modelo de 6-OHDA. También mostramos que la sobrevivencia del trasplante es un factor importante pero no es el único involucrado para inducir la mejora. Dadas las propiedades previamente reportadas de las cromoesferas en comparación con las CC (Chung *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2012; Saxena *et al.*, 2013; Vukicevic *et al.*, 2012) quisimos determinar si en el contexto del modelo de la EP, mostraban alguna diferencia al comparar el trasplante de cromoesferas directamente con trasplantes de CC. Para determinar esto, trasplantamos animales lesionados con 6-OHDA con CC obtenidas de la médula adrenal de bovino y mantenidas durante 3 días en cultivo. En estos animales evaluamos durante 3 meses la conducta de giro inducida con anfetamina y comparamos los resultados con los experimentos realizados en un inicio, donde se evalúa la misma conducta en animales trasplantados con cromoesferas. Encontramos que 8 de 10 animales con trasplante de CC mostraron una disminución (> 10%) en la conducta de giro durante las primeras dos semanas post-trasplante, con una media de 40% de disminución durante la primer evaluación (similar a los animales con trasplante de cromoesferas) (Figura 14a). El promedio de disminución durante los tres meses de evaluación fue de 27%, menor que lo obtenido con el trasplante de cromoesferas (Figura 14a). La disminución observada en el número de giros no fue estadísticamente significativa comparada con su ejecución previa al trasplante, pero sí comparado en algunas evaluaciones con el grupo lesión sin trasplante (Figura 14a, asteriscos negros). Estos

resultados indican que el trasplante de cromoesferas produce mejoras mas consistentes y robustas sobre la conducta de giro al compararse con las CC.



**Figura 14. Comparación entre el trasplante de cromoesferas y el trasplante de CC.** (a) Porcentaje de cambio en la conducta de giro inducida con anfetamina en animales lesionados con 6-OHDA, lesionados con trasplante de cromoesferas (n = 7, naranja) y CC (n = 8, morado). Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar. La línea punteada señala una reducción equivalente al 50%. Se encontraron diferencias significativas en los animales con trasplante de cromafines en las semanas 1, 2 y 8 post-trasplante al compararlos con el grupo lesión sin trasplante (ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 6.991$ ,  $DF = 23$ ,  $p < 0.0001$ , *post-hoc* Tukey,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ )(asteriscos negros) pero no al compararlos con el numero de giros previo al trasplante (ANOVA,  $F = 1.142$ ,  $r^2 = 0.1402$ ,  $p = 0.3485$ ). (b) La sobrevivencia del trasplante de CC fue estimado por conteo directo de células TH<sup>+</sup> en cortes coronales del estriado. Cada punto representa el número de células sobrevivientes de un solo animal, y las barras señalan la media  $\pm$  la desviación estándar. La línea horizontal punteada representa el equivalente a  $1 \times 10^3$  células. Se encontró diferencia significativa al comparar la sobrevivencia de las CC y las cromoesferas a las 12 semanas pot-trasplante (Prueba t para muestras no pareadas,  $P > 0.05$ ,  $t = 3.572$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0051^{**}$ ). (c) Porcentaje de células dopaminérgicas endógenas en la SNpc en relación a cada hemisferio (no lesionado y lesionado) en animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA en ambos grupos trasplantados con CC (gris) y cromoesferas (negro). El número de células TH<sup>+</sup> en la SNpc para ambos hemisferios fue determinado por conteo directo en cortes procesados con inmunohistoquímica para TH. Los datos fueron normalizados al número de células contadas en la SNpc del hemisferio no lesionado. Cada punto representa un animal, y la media  $\pm$  desviación estándar

están indicadas por línea sólida horizontal y vertical. La línea punteada horizontal señala la pérdida del 20% de células TH<sup>+</sup> en el hemisferio lesionado comparado contra el hemisferio no lesionado. No se encontraron diferencias significativas (prueba T de Student no pareada) sugiriendo que el grado de lesión es similar entre ambos grupos utilizados. Tomada y modificada de Boronat-García *et al.*, 2016.

Que el trasplante de CC tenga un menor efecto sobre la conducta de giro puede ser consecuencia de una menor sobrevivencia del trasplante, una liberación deficiente de dopamina/o moléculas afines u otro mecanismo independiente al dopaminérgico. Para poder determinar la sobrevivencia de las CC, cuantificamos el trasplante a las 12 semanas de los mismos animales utilizados en la prueba conductual y comparamos los resultados con la sobrevivencia del trasplante de cromoesferas a las 12 semanas previamente obtenidos (Figura 11d). Al calcular el promedio del número de CC sobrevivientes a las 12 semanas post-trasplante sólo para los dos animales con células sobrevivientes, como fue realizado en los experimentos previos para cromoesferas, encontramos que el trasplante de cromoesferas sobrevive 7.3 veces más que el trasplante de CC, con un promedio de  $634 \pm 34$  células considerando solo los dos animales con trasplante sobreviviente de CC. Sin embargo, 1 de los 3 animales con trasplante sobreviviente de CC no fue incluido en el análisis, puesto que presentaba un inusual número de células que sobrevivieron (~30000 células TH<sup>+</sup>, más grande que el resto de los animales analizados a las 12 semanas y en otros tiempos analizados). Es importante señalar que dicho animal presentó una disminución del 47% en el número de giros durante la última evaluación. Dicha disminución es solo 1.7 veces mejor que el promedio de disminución durante todas las evaluaciones realizadas en los animales con trasplante de CC (27%), y no mejor que la media de disminución observada para los animales con trasplante de cromoesferas (51%).



El grado de lesión en ambos grupos con trasplante (CC y cromoesferas), fue cuantificado en todos los animales mediante el conteo directo del número de células endógenas dentro de la SNpc. En ambos grupos observamos que el grado de lesión correspondía a una lesión severa, donde la SNpc lesionada contenía del 0-10% de células TH<sup>+</sup> respecto al hemisferio no lesionado (Figura 14c). Estos resultados indican que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc inducida por la neurotoxina 6-OHDA es comparable en los grupos analizados.

Además, incluso en un análisis a corto plazo (4 semanas post-trasplante), observamos que sólo 3 de 12 animales presentaban sobrevivencia de CC a niveles muy bajos (0.20, 1.7 y 1.9 x 10<sup>3</sup> de células TH<sup>+</sup> respectivamente, con una media de 1267 ± 536), mientras que el resto de los animales no mostraron señal del trasplante.

## Discusión

En el presente trabajo se evaluó la viabilidad del trasplante de cromoesferas a nivel celular y funcional en el modelo de 6-OHDA de la EP. Determinamos que las cromoesferas pueden sobrevivir y disminuir las alteraciones motoras en algunos animales trasplantados.

### Sobre la sobrevivencia

Al comparar el trasplante de cromoesferas directamente con el de CC, encontramos que las cromoesferas sobreviven en mayor número y durante más tiempo, además de tener efectos conductuales más robustos y más estables. Históricamente, se han utilizado diversas aproximaciones para incrementar la sobrevivencia del trasplante de CC. Una que ha mostrado mejores resultados es adicionar junto con las CC al ser trasplantadas, el factor de crecimiento neuronal (NGF, por sus siglas en inglés). Este factor tiene un papel importante en la sobrevivencia y crecimiento de neuronas periféricas simpáticas (Levi-Montalcini *et al.*, 1968) y promueve la trans-diferenciación de CC favoreciendo el crecimiento de fibras *in vitro* (Unsicker *et al.*, 1978; Doupe *et al.*, 1985). Se ha visto que la sobrevivencia de CC trasplantadas incrementa al ser trasplantadas junto con bombas liberadoras de NGF (sobrevivencia de 0.5% vs 0.12%, 12 semanas post-trasplante) (Strömberg *et al.*, 1985), o junto con células productoras de NGF como células de glioma C6 (sobrevivencia de 0.5% vs 0.13%, 4 semanas post-trasplante) (Bing *et al.*, 1990), astrocitos modificados genéticamente (sobrevivencia de aproximadamente 3.5% vs 0.6%, 2 semanas post-trasplante) (Cunningham *et al.*, 1991) o fibroblastos modificados genéticamente (sobrevivencia de 46% vs 17%, 8 semanas post-trasplante) (Nijima *et al.*, 1995). Estas

aproximaciones incrementan la sobrevivencia de las CC en un rango de 2 a 6 veces. En el caso de las cromoesferas, encontramos una sobrevivencia de 1.5% a las 12 semanas post-trasplante, porcentaje mayor a los resultados reportados en la literatura para CC, salvo con algunas excepciones (*e.g.* Nijima *et al.*, 1995). Sin embargo, al comparar directamente el trasplante de CC bajo las mismas condiciones experimentales empleadas para el trasplante de cromoesferas (*i.e.* donadores, aislamiento, manipulación de los animales, régimen de inmunosupresión, etc.) encontramos que a corto y mediano plazo (4 y 12 semanas post-trasplante) las cromoesferas sobreviven 3.5 y 7 veces mas, respectivamente. En conjunto, estas comparaciones sugieren que el trasplante de cromoesferas es una opción mejor que las CC en términos de sobrevivencia a mediano plazo.

Las diferencias observadas entre el trasplante de CC y el trasplante de cromoesferas pueden derivar de las diferencias moleculares entre ambos tipos celulares, lo que puede influir en como responden al ambiente cuando son trasplantadas. Por un lado, las células de las cromoesferas tienen capacidad de auto-renovación y forman esferas secundarias (Chung *et al.*, 2009) contrario a las CC. Además, el cultivo de cromoesferas incrementa la expresión de marcadores de células troncales neurales como Nestina, CD133, Notch-1, Notch-2, Hes-1, receptor de NGF, Musashi-1, Snai-2, Sox-9, Sox-10 por mencionar algunos, los cuales han sido detectados mediante el análisis del RNAm utilizando RT-PCR (Chung *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2012; Saxena *et al.*, 2013; Vukicevic *et al.*, 2012) y microarreglos (Vukicevic *et al.*, 2015). Contrario a esto, las CC no expresan estos marcadores o los expresan a niveles muy bajos (Chung *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2012). Los mecanismos que regulan el incremento de dichos marcadores no están claros, pero se sabe que el ambiente natural dentro de la glándula adrenal contribuye a los patrones de

expresión moleculares de las células de la médula (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2010). En este sentido, la liberación factores locales desde la corteza adrenal, como hormonas esteroides y factores de crecimiento, influye en la diferenciación de las CC y su proliferación (Ehrhart-Bornstein and Bornstein, 2008; Huber *et al.*, 2009). Por lo que el aislamiento de las células de la médula adrenal junto con las condiciones de cultivo empleadas para la formación de las cromoesferas, pueden contribuir al enriquecimiento y expansión de células de tipo progenitores de CC o su trans-diferenciación y el incremento de los marcadores progenitores neurales. Por lo tanto, las respuestas inmunológicas asociadas por parte del hospedero que conlleva al rechazo del tejido trasplantado pueden ser distintas, así como la capacidad de las células trasplantadas para responder (Barker *et al.*, 2004). Sin embargo, en la respuesta del sistema inmune esta directamente relacionado con la distancia filogenética entre el donador y el receptor (Barker *et al.*, 2004), y en este caso ambas fuentes celulares derivan el mismo donador.

Otro factor que puede influir en la sobrevivencia del trasplante de cromoesferas es su estado agregado. De esta manera las células del exterior de la esfera son las que reciben las señales externas generadas por el hospedero en respuesta a la presencia del trasplante, protegiendo así a las células del centro de la esfera. Además, el estado agregado puede también crear un microambiente en el cual las mismas células de las cromoesferas liberen moléculas como factores tróficos y favorezcan su propia sobrevivencia. En este sentido, Galán-Rodríguez y cols. observaron que el trasplante de CC extra-adenales (obtenidas del órgano de Zuckerkandl) en forma de agregados incrementa la sobrevivencia de las células trasplantadas de 0.15% a 0.8% a los 2 meses post-trasplante (Galán-Rodríguez *et al.*, 2007). Los autores de este trabajo encontraron que las CC extra-adenales agregadas, contienen

factores tróficos como GDNF y TGF- $\beta_1$ . Los autores sugieren que estos factores influyen en la sobrevivencia de las células al ser trasplantadas, efectos que pueden ser potenciados cuando se trasplantan las células en agregados. En CC adrenales también se ha reportado la presencia de factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factores de crecimiento transformante (TGFs), y factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), los cuales promueven la sobrevivencia de neuronas en cultivo (ver Fernandez-Espejo, 2005). Sin embargo, en el caso particular de las cromoesferas, el contenido de factores tróficos no ha sido determinado, pero se sabe que expresan receptores para factores tróficos como por ejemplo el receptor de NGF y responden a bFGF (Chung *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2012; Saxena *et al.*, 2013; Vukicevic *et al.*, 2012).

En términos de sobrevivencia y funcionalidad, las células FMV y las neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias son las fuentes celulares más prometedoras que han sido estudiadas en modelos animales de la EP. Existe gran variabilidad en los reportes de sobrevivencia de estas fuentes celulares al ser trasplantadas, al igual que en el caso de CC. Sin embargo, el nivel sobrevivencia y los efectos funcionales del trasplante de células FMV y neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales son mucho mayores que lo reportado para las CC. Entonces, ¿cómo se compara la sobrevivencia de las cromoesferas con las fuentes celulares más prometedoras? En el caso particular de células FMV se ha reportado que sobreviven en un 0.4% (Studer *et al.*, 1998) y 0.5% (Brundin *et al.*, 1987; Rath *et al.*, 2012) de 9 a 15 semanas post-trasplante, o en un 1.8% nueve meses posterior al trasplante (Herman *et al.*, 1991), es decir niveles similares a lo que encontramos en las cromoesferas (1.5% de las células inicialmente trasplantadas 12 semanas post-trasplante). En el caso de neuronas dopaminérgicas derivadas de células

troncales se han reportado niveles de supervivencia mayores, equivalentes al 2.7% a las 12 semanas post-trasplante (Cho *et al.*, 2008), 4.1% de 4 a 8 semanas post-trasplantes (Kim *et al.*, 2002) y 6% a 18 semanas posteriores al trasplante (Kriks *et al.*, 2011), porcentajes mayores al de las cromoesferas. Por lo tanto, las cromoesferas sobreviven más que las CC y a niveles similares que las células FVM, pero menos que neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales.

## Sobre la funcionalidad

En las pruebas conductuales utilizadas para evaluar la conducta motora en el modelo de 6-OHDA de la EP, observamos que algunos animales con trasplante sobreviviente mostraron disminuciones en las alteraciones motoras de moderadas a prominentes. Un factor importante que debe ser analizado en los trasplantes de cualquier fuente celular en el contexto de la EP es la potencia funcional (*i.e.* el mínimo número de células necesario para inducir una mejora motora significativa). En el presente trabajo, para alcanzar una disminución en la conducta de giro inducida con amfetamina > 40%, un mínimo de 3498 células TH<sup>+</sup> fueron necesarias (Figura 13b). Sin embargo, también observamos que la conducta de giro podía ser casi suprimida con un mínimo de 4245 células. Si bien estos datos son favorables, no son mejores que la potencia funcional reportada para otras fuentes celulares, donde para alcanzar una disminución del 50% en la conducta de giro inducida con apomorfina se ha reportado un mínimo de 657 células FVM sobrevivientes (Rath *et al.*, 2012), y 986 neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales humanas para alcanzar una reducción total en el número de giros inducidos con

anfetamina (Grealish *et al.*, 2014). En ambos casos, la potencia funcional es mayor que la encontrada para las cromoesferas. Una posible explicación podría ser la ausencia de fibras provenientes de las células de las cromoesferas. En este sentido, sería interesante determinar si el trasplante de células derivadas de cromoesferas diferenciadas previamente en cultivo a un fenotipo más neuronal-dopaminérgico (Vukicevic, Celis, *et al.*, 2012; Vukicevic, Schmid, *et al.*, 2012) puede mejorar la potencia funcional, permitiendo una mejor integración al sitio del trasplante.

En términos de la relación entre la sobrevivencia y los efectos funcionales del trasplante de cromoesferas, los resultados encontrados no son comparables con resultados derivados de trasplantes de células FVM y neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales encontrados en la literatura. Sin embargo, es importante señalar que cuando el trasplante de cromoesferas sobrevive produce mejoras motoras de moderadas a prominentes evaluadas con distintas pruebas conductuales. La mejora motora observada fue estable y más robusta durante el total del tiempo de evaluación (3 meses) en comparación al trasplante de CC reportado en el presente trabajo y lo observado por otros autores (Date *et al.*, 1997; Fernandez-Espejo *et al.*, 2001; Freed *et al.*, 1981). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que las cromoesferas constituyen una mejor fuente celular que las CC en términos de sobrevivencia y funcionalidad, mientras que conservan las ventajas adicionales de fuentes derivadas de la médula adrenal como son su fácil obtención y el uso de tejido adulto como donador.

En términos de funcionalidad, las diferencias observadas entre el trasplante de cromoesferas y el de CC pueden derivar de las diferencias a nivel celular y molecular entre ambas fuentes celulares (*e.g.* mayor número de células con fenotipo dopaminérgico en las

cromoesferas, y sobreviven más al ser trasplantadas). *In vitro*, corroboramos que las cromoesferas tienen un mayor fenotipo dopaminérgico en comparación a las CC recién aisladas, tanto a nivel de expresión de marcadores dopaminérgicos como a nivel funcional de liberación de dopamina. En este contexto es importante mencionar que bFGF es agregado al medio de cultivo para favorecer la expansión y formación de cromoesferas. Este factor mitogénico ha mostrado que incrementa el número de neuronas dopaminérgicas derivadas de cultivos de células FVM (Bouvier and Mytilineou, 1995) y ha sido utilizado en distintos protocolos de cultivo para la diferenciación *in vitro* de células troncales embrionarias humanas a neuronas dopaminérgicas para ayudar a su sobrevivencia (Correia *et al.*, 2008). En CC, agregar bFGF al cultivo ha mostrado que induce su trans-diferenciación promoviendo el crecimiento de procesos desde CC, pero en menor proporción que el NGF (Stemple *et al.*, 1988). Sin embargo, las CC trans-diferenciadas han mostrado que no logran sobrevivir por más de 6 días en un medio de cultivo con bFGF (Stemple *et al.*, 1988), contrario a las cromoesferas que pueden ser mantenidos durante varias semanas (Chung *et al.*, 2009).

Los mecanismos por los cuales el trasplante de cromoesferas induce mejoras motoras no fueron corroborados en el presente trabajo, pero con base en los resultados podemos especular sobre algunos mecanismos. En general, existen dos hipótesis asociadas a la funcionalidad de los trasplantes en el contexto de la EP. Por un lado, el trasplante puede tener efectos neuroprotectores tras liberar factores tróficos que protegen a las fibras dopaminérgicas remanentes endógenas, y así incrementar los niveles de dopamina dentro del estriado y por ende disminuir las alteraciones motoras. Por otro lado, el trasplante puede liberar dopamina directamente en el sitio donde es colocado. La liberación de dopamina



puede darse sin que el trasplante se integre al circuito (actuando como bomba liberadora independiente a las señales del hospedero), o integrándose al circuito (respondiendo ante las señales del sistema de manera regulada mediante la formación de conexiones maduras). El primer escenario (*i.e.* efecto trófico) ha sido relacionado con el mecanismo de acción de los trasplantes de CC (Freed *et al.*, 1986; Date *et al.*, 1990; Date *et al.*, 1996; Galán-Rodríguez *et al.*, 2008). En el caso de las cromoesferas, la ausencia de marcaje para TH fuera de la zona del trasplante así como niveles similares de marcaje para TH en el estriado lesionado de los grupos 6-OHDA y 6-OHDA+ cromoesferas, es evidencia a favor de la ausencia de un efecto protector sobre la vía dopaminérgica nigro-estriatal.

Descartando un efecto neuroprotector por parte del trasplante de cromoesferas, las pruebas conductuales utilizadas sugieren que el mecanismo subyacente está asociado a la liberación de dopamina desde las células trasplantadas. Por un lado, las pruebas farmacológicas están dirigidas al estudio de los desbalances en la neurotransmisión dopaminérgica entre el hemisferio lesionado y el intacto, promoviendo directamente la liberación de dopamina (anfetamina) o activando los receptores dopaminérgicos post-sinápticos (apomorfina). En la prueba de la viga, la administración de agentes que incrementan la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado de ratas envejecidas (*e.g.* levodopa y anfetamina) mejora su ejecución en la tarea (Drucker-Colín and García-Hernández, 1991), esto sugiere que la liberación de dopamina también juega un papel importante en el resultado observado en la prueba no-farmacológica. Sin embargo, otras sustancias liberadas por el trasplante podrían tener efectos similares. Entre estas sustancias, noradrenalina y adrenalina podrían también intervenir, pues se ha observado que estos neurotransmisores también pueden activar los receptores dopaminérgicos (Lanau *et al.*,

1997; Root *et al.*, 2015), además nuestros resultados *in vitro* demuestran que son también liberadas por las cromoesferas en mayor cantidad en comparación a la dopamina (Figura 6). Es importante señalar que como consecuencia de la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos en el hemisferio lesionado (Creese *et al.*, 1977; Kelly *et al.*, 1975; Kim *et al.*, 2000), cantidades bajas de dopamina liberada pueden tener un efecto prominente e incrementar la respuesta conductual asociada a la función dopaminérgica. Sin embargo, es importante determinar en futuras investigaciones las moléculas que el trasplante de cromoesferas libera *in vivo*, incluyendo dopamina y otras catecolaminas.

Un último aspecto a considerar dentro del mecanismo de acción del trasplante de cromoesferas, es si funcionan como bombas que liberan las moléculas sin regulación fisiológica o si se integran al circuito y liberan reguladamente en respuesta a conexiones sinápticas. Para responder esta pregunta sería necesario realizar estudios electrofisiológicos y determinar si el trasplante tiene conexiones funcionales con neuronas del hospedero. Sin embargo, algo que llama la atención de nuestros resultados es que desde la primer semana post-trasplante ya se observa una disminución en las alteraciones motoras de algunos animales con trasplante, además de que el efecto funcional no pareciera incrementar con el tiempo. En el caso de neuronas derivadas de células troncales humanas se ha visto que requieren varios meses después de su trasplante para que maduren y se integren al circuito (Deacon *et al.*, 1994; Pakzaban *et al.*, 1994; Picani *et al.*, 2000), generando efectos conductuales que son graduales en el tiempo (Kirkeby *et al.*, 2012; Steinbeck *et al.*, 2015). Por lo tanto, a corto plazo pareciera que las cromoesferas funcionan más como bombas liberadoras, lo cual no descarta que a largo plazo las células formen conexiones maduras.

## Sobre su aplicación a la clínica

El estudio de nuevas fuentes celulares en el contexto de la terapia de reemplazo celular para la EP tiene como objetivo final su aplicación a la clínica. El presente trabajo no propone que las cromoesferas sean una opción lista para esto, a pesar de que son una mejor opción que las CC y parecen ser más similares a las fuentes celulares más prometedoras. Nuestros resultados indican que existen muchos aspectos a nivel de mecanismos básicos, relacionados a la sobrevivencia y la funcionalidad del trasplante, que deben ser estudiados y optimizados en futuras investigaciones.

Una de las preguntas clave, blanco de investigaciones actuales, es el estudio de los factores involucrados para la eliminación rápida y total del trasplante. A nivel clínico esto es relevante para asegurar un 100% de casos con trasplante viable. En el caso de las cromoesferas, encontramos que del total de animales trasplantados ( $n = 72$ ) sólo el ~57% ( $n = 41$ ) de éstos contenían células trasplantadas (de pocas a varios miles de células TH<sup>+</sup>) (Tabla 2), reflejando un alto nivel de rechazo del trasplante a pesar del uso de ciclosporina A como inmunosupresor. Otros estudios han mostrado resultados similares utilizando otras fuentes celulares (Jensen *et al.*, 2012; Maya-Espinosa *et al.*, 2015; Robertson *et al.*, 2013; Zietlow *et al.*, 2005). Por ejemplo, en un estudio de nuestro laboratorio (Maya-Espinosa *et al.*, 2015) donde se trasplantó células troncales derivadas de cuerpos embrionarios en distintas zonas del cerebro (estriado, corteza y en la vía rostral migratoria) de animales sanos, se observó que del total de animales trasplantados ( $n = 70$ ) evaluados 7, 15 y 21 días post-trasplante, sólo el 57% ( $n = 40$ ) de éstos tenían células trasplantadas sobrevivientes, independientemente del sitio elegido de trasplante. En otro estudio donde se comparan

distintos métodos de administración del inmunosupresor ciclosporina y la sobrevivencia de trasplantes de células progenitoras neurales en el estriado intacto (Jensen *et al.*, 2012), se reportó que sólo 17% de los animales trasplantados (e inmunosuprimidos mediante régimen oral) tenían células sobrevivientes 17 días después. Además, se han reportado porcentajes similares de animales con trasplante en el estriado lesionado de células progenitoras neuronales derivadas de células troncales humanas, obteniendo desde 50% a 86% de animales con trasplante dependiendo del tiempo analizado (20 y 4 semanas post-trasplante, respectivamente) (Zietlow *et al.*, 2005).

Los mecanismos asociados a la eliminación rápida y efectiva del trasplante de cromoesferas no los conocemos. Sin embargo, con base en los resultados podemos ver que se encuentran activos desde los primeros días post-trasplante: A tan solo 24 h post-trasplante 5 de 6 animales contenían trasplante, en los que el 84% de las células trasplantadas habían sido eliminadas, y una semana después el 95% de las células iniciales habían muerto. Es muy probable que la respuesta del sistema inmune este asociada a la rápida y efectiva pérdida del trasplante (a pesar de haber utilizado un régimen de inmunosupresión). En este sentido el rechazo del trasplante involucra componentes celulares y humorales, y su intensidad dependerá de varios factores como la relación filogénica entre el donador y el hospedero, el modo y el sitio de trasplante (Barker *et al.*, 2004). Las respuestas del sistema inmune se pueden clasificar en dos respuestas que ocurren a distintos tiempos (ver Mathieux *et al.*, 2014). La primera fase se observa dentro de los primeros días post-trasplante e involucra la infiltración masiva de macrófagos y microglía. La segunda fase es una respuesta retrasada que ocurre posterior a las 4 semanas post-trasplante, mediada por células T. Dado que la respuesta del sistema inmune es

compleja y depende de diversos factores, es indispensable determinar cuál o cuáles son las asociadas al trasplante de cromoesferas, y de esta manera determinar si posible optimizar la sobrevivencia del trasplante cambiando, por ejemplo, el régimen de inmunosupresión, o añadiendo agentes externos que inhiban las respuestas generadas en el hospedero.

Otro aspecto fundamental que debe ser estudiado esta relacionado con los factores involucrados para que la funcionalidad del trasplante. Nosotros observamos que la sobrevivencia del trasplante de cromoesferas no es el único requisito para generar efectos sobre la conducta motora, pues ciertos animales no mostraron mejora a pesar de tener un numero de células sobrevivientes equivalente a aquellos animales con mejora robusta (Figura 13b). Posibles causas pueden ser atribuidas a factores que imposibiliten la comunicación y la integración del trasplante en el hospedero, lo que nos hace volver al tema del sistema inmune. La cicatriz glial que se forma en respuesta a daños en el sistema nervioso, es una barrera que impide la comunicación física y química entre el tejido dañado y el sano (Silver & Miller, 2004). Además, se ha observado que prevenir la formación de la cicatriz glial utilizando ratones transgénicos (ratones deficientes en proteína ácida fibrilar glial y vimetina) genera un ambiente permisivo para la sobrevivencia, migración e integración de células trasplantadas en retina (Kinouchi *et al.*, 2003). Este mismo mecanismo podría prevenir que las células del trasplante de cromoesferas extiendan proyecciones hacia fuera de la región del trasplante además de bloquear la comunicación química entre trasplante y el hospedero. Sin embargo, futuras investigaciones serán necesarias para determinar si este es el mecanismo involucrado y si se puede optimizar para asegurar que cuando el trasplante sobreviva sea también funcional.

## Conclusiones

- El cultivo de cromoesferas incrementa el número de células TH<sup>+</sup> y la liberación de dopamina basal, mientras que mantiene los niveles iniciales de adrenalina y noradrenalina.
- El trasplante de cromoesferas mejora las alteraciones motoras observadas en el modelo de 6-OHDA en poco menos del 60% de los animales. En dichos animales, puede reducir las alteraciones derivadas de la disminución de dopamina en el estriado (evaluadas con la prueba de giro) y mejorar la coordinación motriz (evaluada con la prueba de la viga).
- El trasplante de cromoesferas sobrevive en poco menos del 60% de los animales trasplantados. A partir de la primer semana post-trasplante la sobrevivencia de las células equivale sólo al 5% del número de células originalmente trasplantadas. Un mes y tres meses posteriores al trasplante, el número de células sobrevivientes equivale sólo al 1.5% inicial trasplantado.
- Para inducir una mejora moderada del 50% en la conducta de giro inducida con anfetamina encontramos un mínimo de 3 500 células sobrevivientes. Para una mejora prominente de casi 100% encontramos un mínimo de 4 000 células. La sobrevivencia del trasplante de cromoesferas es necesaria pero no es el único factor determinante para inducir mejora funcional.
- El trasplante de cromoesferas es mejor que el de CC en términos de sobrevivencia y efectos funcionales, pues sobreviven en mayor número y durante más tiempo y disminuyen la conducta de giro de forma mas robusta y estable.

## Perspectivas

- Determinar los mecanismos responsables de la mejora motora inducida por el trasplante de cromoesferas.
- Determinar el papel del sistema inmunológico en la eliminación del trasplante de cromoesferas.
- Determinar si es posible optimizar la potencia funcional del trasplante de cromoesferas.

## Referencias

- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* 1946; 94: 239–47.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989; 12: 366–75.
- Aldrin-Kirk P, Heuer A, Wang G, Mattsson B, Lundblad M, Parmar M, et al. DREADD Modulation of Transplanted DA Neurons Reveals a Novel Parkinsonian Dyskinesia Mechanism Mediated by the Serotonin 5-HT<sub>6</sub> Receptor. *Neuron* 2016
- Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 1990; 13: 266–71.
- Anderson D, Carnahan M, Patterson P. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo, and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage. *J. Neurosci.* 1991; 11: 3507–19.
- Arbuthnott G, Dunnett S, MacLeod N. Electrophysiological properties of single units in dopamine-rich mesencephalic transplants in rat brain. *Neurosci. Lett.* 1985; 57: 205–210.
- Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Kophin IJ, Jacobowitz DM, London WT, Oldfield EH. Transient behavioral recovery in hemiparkinsonian primates after adrenal medullary allografts. *Prog. Brain Res.* 1988; 78: 543–9.
- Barker RA, Drouin-Ouellet J, Parmar M. Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. *Nat. Rev. Neurol.* 2015; 11: 492–503.
- Barker RA & Widner Håkan (2004) Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx.* 1:472-481.
- Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Rev.* 11: 268–77.
- Bing G, Notter MFD, Hansen JT, Kellogg C, Kordower JH, Gash DM. Cografts of adrenal medulla with C6 glioma cells in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions. *Neuroscience* 1990; 34: 687–697.
- Bjorklund A, Kordower JH. Cell therapy for Parkinson’s disease: what next? *Mov. Disord.* 2013; 28: 110–5.
- Björklund A, Schmidt RH, Stenevi U. Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 1980; 212: 39–45.



Björklund A, Stenevi U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 1979; 177: 555–560.

Björklund L, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IYC, McNaught KSP, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 2344–2349.

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012; 2012: 845618.

Bohn MC, Cupit L, Marciano F, Gash DM. Adrenal medulla grafts enhance recovery of striatal dopaminergic fibers. *Science* 1987; 237: 913–6.

Boronat-García A, Palomero-Rivero M, Guerra-Crespo M, Millán-Aldaco D, Drucker-Colín R (2016) Intra-striatal Grafting of Chromospheres: Survival and Functional Effects in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 11(8): e0160854. doi:10.1371/journal.pone.0160854

Boronat-García A, Guerra-Crespo M, Drucker-Colín R (2017) A Historical Perspective of Cell Transplantation in Parkinson's disease. *World Journal of Transplantation* (manuscrito en revisión)

Bouvier MM, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J. Neurosci.* 1995; 15: 7141–9.

Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 121–34.

Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). . *J. Neurol.* 2002; 249 Suppl : III/1–5.

Brown V, Dunnett SB. Comparison of adrenal and foetal nigral grafts on drug-induced rotation in rats with 6-OHDA lesions. *Exp Brain Res* 1989; 78: 343–368.

Brown VJ, Dunnett SB. Comparison of adrenal and foetal nigral grafts on drug-induced rotation in rats with 6-OHDA lesions. *Exp. brain Res.* 1989; 78: 214–8.

Brundin P, Nilsson OG, Strecker RE, Lindvall O, Astedt B, Björklund A. Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. . *Exp. brain Res.* 1986; 65: 235–40.

Carnahan J, Patterson P. Generation of monoclonal antibodies that bind preferentially to adrenal chromaffin cells and the cells of embryonic sympathetic ganglia. *J. Neurosci.* 1991; 11: 3493–3506.

Cho MS, Lee Y-E, Kim JY, Chung S, Cho YH, Kim D-S, et al. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. . Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008; 105: 3392–7.

Chung K-F, Sicard F, Vukicevic V, Hermann A, Storch A, Huttner WB, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. . Stem Cells 2009; 27: 2602–13.

Correia AS, Anisimov S V, Li J-Y, Brundin P. Growth factors and feeder cells promote differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons: a novel role for fibroblast growth factor-20. Front. Neurosci. 2008; 2: 26–34.

Creese I, Burt D, Snyder S. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity . Science (80-. ). 1977; 197: 596–598.

Cunningham LA, Hansen JT, Priscilla Short M, Churchill Bohn M. The use of genetically altered astrocytes to provide nerve growth factor to adrenal chromaffin cells grafted into the striatum . Brain Res. 1991; 561: 192–202.

Date I, Felten SY, Olschowka JA, Felten DL. Limited recovery of striatal dopaminergic fibers by adrenal medullary grafts in MPTP-treated aging mice. . Exp. Neurol. 1990; 107: 197–207.

Date I, Shingo T, Ohmoto T, Emerich DF. Long-Term Enhanced Chromaffin Cell Survival and Behavioral Recovery in Hemiparkinsonian Rats with Co-grafted Polymer-Encapsulated Human NGF-Secreting Cells. Exp. Neurol. 1997; 17: 10–17.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron 2003; 39: 889–909.

Deacon T-W, Pakzaban, P., Burns, L.H., Dinsmore, J., Isacson, O. (1994). Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distant axon growth of porcine striatal xenografts in rats. [Exp Neurol](#). 130:151-67.

DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. Trends Neurosci. 1990; 13: 281–5.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. . Neurology 2007; 68: 384–6.

Doupe A, Landis S, Patterson P. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: Glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. J. Neurosci. 1985; 5: 2119–42.

Drucker-Colín R, Anías-Calderón J. Ganglios basales. In: Drucker-Colín R, editor(s).

Fisiología Médica. México: Manual Moderno; 2005. p. 853–860.

Drucker-Colín R, García-Hernández F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J. Neurosci. Methods* 1991; 39: 153–161.

Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruiz J, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A, et al. Comparison between low frequency magnetic field stimulation and nerve growth factor treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties, and grafting in nigrostriatal lesioned rats. *Mol. Cell. Neurosci.* 1994; 5: 485–98.

Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1148: 112–7.

Ehrhart-Bornstein M, Vukicevic V, Chung K-F, Ahmad M, Bornstein SR. Chromaffin progenitor cells from the adrenal medulla. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010; 30: 1417–23.

Fasano A, Daniele A, Albanese A. Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. *Lancet. Neurol.* 2012; 11: 429–42.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114: 2283–301.

Fernandez-Espejo E, Armengol J a, Flores J a, Galan-Rodriguez B, Ramiro S. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005; 49: 343–54.

Fernandez-Espejo E, Gonzalez-Albo MC, Moraes J, Banoua F El, Flores JA, Caraballo I. Functional Regeneration in a Rat Parkinson's Model after Intrastratial Grafts of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Transforming Growth Factor b1 -Expressing Extra-Adrenal Chromaffin Cells of the Zuckerkandl's Organ. *J. Neurosci.* 2001; 21: 9888–9895.

Fiandaca MS, Kordower JH, Hansen JT, Jiao SS, Gash DM. Adrenal medullary autografts into the basal ganglia of Cebus monkeys: Injury-induced regeneration. *Exp. Neurol.* 1988; 102: 76–91.

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996; 55: 259–272.

Francis N, Landis S. Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annu. Rev. Neurosci.* 1999; 22: 541–66.

Freed WJ, Morihisa JM, Spoor E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, et al. Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature* 1981; 292: 351–2.

Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. . *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: 160–4.

Galan-Rodriguez B, del-Marco a, Flores J a, Ramiro-Fuentes S, Gonzalez-Aparicio R, Tunez I, et al. Grafts of extra-adrenal chromaffin cells as aggregates show better survival rate and regenerative effects on parkinsonian rats than dispersed cell grafts. . *Neurobiol. Dis.* 2008; 29: 529–42.

García-Montes J-R, Boronat-García A, López-Colomé A-M, Bargas J, Guerra-Crespo M, Drucker-Colín R. Is nicotine protective against Parkinson's disease? An experimental analysis. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2012; 11: 897–906.

Grealish S, Diguët E, Kirkeby A, Mattsson B, Heuer A, Bramouille Y, et al. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 653–665.

Grealish S, Jönsson ME, Li M, Kirik D, Björklund A, Thompson LH. The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* 2010; 133: 482–95.

Guerra-Crespo M, de la Herrán-Arita AK, Hernández-Cruz A, Bargas J, Drucker-Colín R. Cell Therapy for Parkinson ' s Disease : Failure or Success ? In: Gholamrezanezhad A, editor(s). *Stem Cells in Clinic and Research.* 2011.

Haehner A, Hummel T, Reichmann H. Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. . *Expert Rev. Neurother.* 2009; 9: 1773–9.

Huber K, Kalcheim C, Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. . *Auton. Neurosci.* 2009; 151: 10–6.

Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol.* 2006; 298: 335–343.

Huot P, Johnston TH, Koprach JB, Fox SH, Brotchie JM. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.* 2013; 65: 171–222.

Jellinger KA. Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution--a pilot study. . *Acta Neuropathol.* 2003; 106: 191–201.

Jenner P. Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 2003; 16 Suppl 1: S3–7.

Jensen MB, Krishnaney-Davison R, Cohen LK, Zhang S-C. Injected Versus Oral Cyclosporine for Human Neural Progenitor Grafting in Rats. . *J. Stem Cell Res. Ther.*

2012; Suppl 10: 003.

Kelly PH, Seviour PW, Iversen SD. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. . *Brain Res.* 1975; 94: 507–22.

Kim DS, Szczycka MS, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. . *J. Neurosci.* 2000; 20: 4405–13.

Kim J-H, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson ' s disease. *Nature* 2002; 418: 50–6.

Kinouchi R, Takeda M, Yang L, Wilhelmsson U, Lundkvist A, Pekny M & Chen D F (2003) Robust neural integration from retinal trasplants in mice deficient in GFAP and vimetin, *Nature Neurosci.* 6: 863-868

Kriks S, Shim J-W, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson ' s disease. . *Nature* 2011; 480: 547–51.

Lanau F, Zenner MT, Civelli O, Hartman DS. Epinephrine and norepinephrine act as potent agonists at the recombinant human dopamine D4 receptor. . *J. Neurochem.* 1997; 68: 804–12.

Levi-Montalcini R, Angeletti P. The nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968;48: 534–69.

Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson ' s disease-give up or move forward? *Mov. Disord.* 2013; 28: 268–273.

Mathiex E, Bonnamain V, Naveilhan P & Nevey I (2014) Immune response to intracerebral trasplantation, en *Stem Cell and Neurodegenerative Diseases.* Lescaudron L, Rossignol J & Dunbar GL (eds). CRC Press. pp. 157-177.

Maya-Espinosa G, Collazo-Navarrete O, Millán-Aldaco D, Palomero-Rivero M, Guerrero-Flores G, Drucker-Colín R, et al. Mouse embryonic stem cell-derived cells reveal niches that support neuronal differentiation in the adult rat brain. . *Stem Cells* 2015; 33: 491–502.

Neve K, Seamans J, Trantham-Davidson J. Dopamine receptor signaling. *J. Recept. signal Transduct. Res.* 2004; 24: 165–205.

Nijijima K, Chalmers GR, Peterson DA, Fisher LJ, Patterson PH, Gage FH. Enhanced survival and neuronal differentiation of adrenal chromaffin cells cografted into the striatum

with NGF-producing fibroblasts. . *J. Neurosci.* 1995; 15: 1180–94.

Nishino H, Ono T, Shibata R, Kawamata S, Watanabe H, Shiosaka S, et al. Adrenal medullary cells transmute into dopaminergic neurons in dopamine-depleted rat caudate and ameliorate motor disturbances. . *Brain Res.* 1988; 445: 325–37.

Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: Distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system . *Acta Neuropathol.* 1976; 34: 311–319.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. . *Nature* 2007; 448: 313–7.

Olson L. Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medullary tissue. *Histochemistry* 1970; 22: 1–7.

Pakzaban, P., Isacson, O., 1994. Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience* 62, 989–1001.

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger a, Olson L, Wyatt RJ. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 1979; 204: 643–647.

Piccini, P., Lindvall, O., Bjorklund, A., Brundin, P., Hagell, P., Ceravolo, R., Oertel, W., Quinn, N., Samuel, M., Rehncrona, S., Widner, H., Brooks, D.J., 2000. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann. Neurol.* 48, 689–695.

Powers J, Evinger M, Zhi J. Pheochromocytomas in Nf1 knockout mice express a neural progenitor gene expression profile. *Neuroscience* 2007; 147: 928–937.

Rath A, Klein A, Papazoglou A, Pruszek J, Garciaa J, Krause M, et al. Survival and Functional Restoration of Human Fetal Ventral Mesencephalon Following Transplantation in a Rat Model of Parkinson's Disease . *Cell Transplant.* 2012; 22: 1281–1293.

Rioux L, Gaudin DP, Gagnon C, Di Paolo T, Bedard PJ. Decrease of behavioral and biochemical denervation supersensitivity of rat striatum by nigral transplants . *Neuroscience* 1991; 44: 75–83.

Robertson VH, Evans AE, Harrison DJ, Precious S V, Dunnett SB, Kelly CM, et al. Is the adult mouse striatum a hostile host for neural transplant survival? *Neuroreport* 2013; 24: 1010–5.

Root DH, Hoffman AF, Good CH, Zhang S, Gigante E, Lupica CR, et al. Norepinephrine activates dopamine D4 receptors in the rat lateral habenula. . *J. Neurosci.* 2015; 35: 3460–9.

Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of

human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. . *Nat. Med.* 2006; 12: 1259–68.

Salat D, Noyce AJ, Schrag A, Tolosa E. Challenges of modifying disease progression in prediagnostic Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2016; 15: 637–648.

Santana MM, Chung K-F, Vukicevic V, Rosmaninho-Salgado J, Kanczkowski W, Cortez V, et al. Isolation, characterization, and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. . *Stem Cells Transl. Med.* 2012; 1: 783–91.

Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, Stadel D, Braubach P, Debatin K-M, et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. . *PLoS One* 2013; 8: e64454.

Schallert T, Upchurch M, Wilcox RE, Vaughn DM. Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983; 18: 753–9.

Sedelis M, Schwarting R, Huston J. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 2001; 109–125.

Sicard F, Ehrhart-Bornstein M, Corbeil D, Sperber S, Krug AW, Ziegler CG, et al. Age-dependent regulation of chromaffin cell proliferation by growth factors, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104: 2007–12.

Silver J & Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews.* 5:146-156

Simola N, Morelli M. The 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. 2007; 11: 151–167.

Smith Y, Wichmann T. *Functional Anatomy and Physiology of the Basal Ganglia: Motor Functions.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008.

Sørensen AT, Thompson L, Kirik D, Björklund A, Lindvall O, Kokaia M. Functional properties and synaptic integration of genetically labelled dopaminergic neurons in intrastriatal grafts. . *Eur. J. Neurosci.* 2005; 21: 2793–9.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. [alpha]-Synuclein in Lewy bodies. 1997; 388: 839–840.

Stemple DL, Mahanthappa NK, Anderson DJ. Basic FGF induces neuronal differentiation, cell division, and NGF dependence in chromaffin cells: A sequence of events in sympathetic development. *Neuron* 1988; 1: 517–525.

Strömberg I, Herrera-Marschitz M, Ungerstedt U, Ebendal T, Olson L. Chronic implants of

chromaffin tissue into the dopamine-denervated striatum. Effects of NGF on survival, fiber growth and rotational behavior. *Exp Brain Res* 1985; 60: 335–349.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 228–35.

Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 933–8.

Taylor J, Elsworth J, Roth R, Sladek J, Redmond D. Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- induced Parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaesus*). *Neuroscience* 1997; 81: 745–55.

Tischler AS, Ruzicka LA, Donahue SR, DeLellis RA. Chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1989; 7: 439–48.[cited 2016 Feb 1] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2816483>

Tolosa E, Marti M, Katzenschlager K. Pharmacological management of Parkinson's disease. In: Jancovic J, Tolosa E, editor(s). *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2015. p. 86–111.

Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells : Impairment by glucocorticoids. 1978; 75: 3498–3502.

Verhofstad A. Kinetics of adrenal medullary cells. *J. Anat.* 1993; 183: 315–26.

Voutilainen MH, Bäck S, Pörsti E, Toppinen L, Lindgren L, Lindholm P, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2009; 29: 9651–9.

Vukicevic V, Celis MFR De, Diaz-valencia G, Bornstein SR, Ehrhart-bornstein M. Modulation of Dopaminergic Neuronal Differentiation from Sympathoadrenal Progenitors. 2012

Vukicevic V, Rubin de Celis MF, Pellegata NS, Bornstein SR, Androutsellis-Theotokis A, Ehrhart-Bornstein M. Adrenomedullary progenitor cells: Isolation and characterization of a multi-potent progenitor cell population. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015; 408: 178–84.

Vukicevic V, Schmid J, Hermann A, Lange S, Gebauer L, Chung K, et al. Differentiation of Chromaffin Progenitor Cells to Dopaminergic Neurons. 2012

Wang Y, Lin JC, Chiou AL, Liu JY, Liu JC, Zhou FC. Human ventromesencephalic grafts restore dopamine release and clearance in hemiparkinsonian rats. *Exp. Neurol.* 1995; 136: 98–106.



Wang Y, Wang SD, Lin SZ, Liu JC. Restoration of dopamine overflow and clearance from the 6-hydroxydopamine lesioned rat striatum reinnervated by fetal mesencephalic grafts. . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 270: 814–21.

Whishaw IQ, O'Connor WT, Dunnett SB. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain* 1986; 109: 805–43.

Wickens J, Reynolds J, Hyland B. Neural mechanisms of rewards-related motor learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003; 6: 685–90.

Xia Q, Liao L, Cheng D, Duong DM, Gearing M, Lah JJ, et al. Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. . *Front. Biosci.* 2008; 13: 3850–6.

Zetterstrom T, Brundin P, Gage FH, Sharp T, Isacson O, Dunnett SB, et al. In vivo measurement of spontaneous release and metabolism of dopamine from intrastriatal nigral grafts using intracerebral dialysis. *Brain Res.* 1986; 362: 344–349.

Zietlow R, Pekarik V, Armstrong RJE, Tyers P, Dunnett SB, Rosser AE. The survival of neural precursor cell grafts is influenced by in vitro expansion. *J. Anat.* 2005; 207: 227–40.

## Anexos

RESEARCH ARTICLE

# Intrastratial Grafting of Chromospheres: Survival and Functional Effects in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease

Alejandra Boronat-García, Marcela Palomero-Rivero, Magdalena Guerra-Crespo, Diana Millán-Aldaco, René Drucker-Colín\*

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neuropatología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

\* [drucker@unam.mx](mailto:drucker@unam.mx)



OPEN ACCESS

**Citation:** Boronat-García A, Palomero-Rivero M, Guerra-Crespo M, Millán-Aldaco D, Drucker-Colín R (2016) Intrastratial Grafting of Chromospheres: Survival and Functional Effects in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 11(8): e0160854. doi:10.1371/journal.pone.0160854

**Editor:** Joohyung Lee, Hudson Institute, AUSTRALIA

**Received:** March 2, 2016

**Accepted:** July 26, 2016

**Published:** August 15, 2016

**Copyright:** © 2016 Boronat-García et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the following grants: Dirección General Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) [IN204612], Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [179927] and Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECITI) [ICyTDF/170/2012-SECITI/014/2013]. The funding source had not any involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing or in any decision made for publication.

## Abstract

Cell replacement therapy in Parkinson's disease (PD) aims at re-establishing dopamine neurotransmission in the striatum by grafting dopamine-releasing cells. Chromaffin cell (CC) grafts produce some transitory improvements of functional motor deficits in PD animal models, and have the advantage of allowing autologous transplantation. However, CC grafts have exhibited low survival, poor functional effects and dopamine release compared to other cell types. Recently, chromaffin progenitor-like cells were isolated from bovine and human adult adrenal medulla. Under low-attachment conditions, these cells aggregate and grow as spheres, named chromospheres. Here, we found that bovine-derived chromosphere-cell cultures exhibit a greater fraction of cells with a dopaminergic phenotype and higher dopamine release than CC. Chromospheres grafted in a rat model of PD survived in 57% of the total grafted animals. Behavioral tests showed that surviving chromosphere cells induce a reduction in motor alterations for at least 3 months after grafting. Finally, we found that compared with CC, chromosphere grafts survive more and produce more robust and consistent motor improvements. However, further experiments would be necessary to determine whether the functional benefits induced by chromosphere grafts can be improved, and also to elucidate the mechanisms underlying the functional effects of the grafts.

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by non-motor and motor symptoms. The latter are the principal targets of current pharmacological therapies, as they are the most disabling for the patients. The physiopathology of PD motor symptoms is associated with the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), which project to the striatum and release dopamine [1]. As a consequence, the dopamine levels in the striatum decrease, leading to the classical motor alterations in PD, such as resting tremor, muscle stiffness, paucity of voluntary movements and postural instability [2].

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Levodopa is the gold standard choice for treating the motor symptoms, but levodopa doses have to be increased with the progress of the disease, inducing motor complications and side effects (e.g. dyskinesias) [3]. As an alternative, cell replacement therapy was proposed during the eighties decade, and was aimed at providing an external source of dopamine in the striatum by grafting dopamine-releasing cells [4]. Chromaffin cells (CC) from the adrenal gland were one of the first types of grafted cells to be tested, due to their ability to release catecholamines and other neuroactive molecules [5]. In animal models of PD, CC grafting was shown to induce moderate but highly variable motor improvements [5–7], even though only 1% of CC are able to release dopamine [8]. In the clinic, however, these cells have not yielded satisfactory results, as their grafting in human patients produced only partial motor improvements [9] that were only transitory and highly variable among subjects [10]. Furthermore, high morbidity and mortality were associated with this grafting procedure, precluding further use of CC grafts [10].

Other types of cells have been tested in animal models as possible sources for cell replacement therapy, including fetal ventral-mesencephalic cells [11–13], and more recently embryonic and induced-pluripotent stem cells [14]. These cells can acquire a dopaminergic phenotype and are considered the most promissory alternative cell sources so far, as they have been shown to survive for longer periods of time than CC and to induce more robust motor improvements [14]. However, the use of these cells involves other important problems, including ethical and technical concerns related to the use of fetal-derived cells (e.g. fetal ventral-mesencephalic cells) or the tumorigenic potential associated with the use of proliferative cells [15–17]. These issues have limited their therapeutic application. Accordingly, it has been suggested that the search for an ideal source for cell replacement therapy in PD must be guided by the following requirements [18]: to be from human origin, to have the possibility of differentiating in large proportions into a dopaminergic phenotype (especially by showing the properties of SNpc neurons) and to produce significant motor improvements after being grafted in animal models of PD without any side effects, including tumor development. In addition, it would be preferable that the cell source is easy to obtain and to maintain in culture.

Recently, in an effort to isolate progenitor-like cells from adult adrenal medulla, Ehrhart-Bornstein and coworkers developed an isolation cell-culture protocol, which permits the expansion of progenitor-like cells from the adrenal medullae of postnatal mice [19], adult bovines [20] and humans [21]. Under low-attachment conditions, these progenitor-like cells aggregate and grow as spheres, named chromospheres. Chromosphere cells have a limited capacity of self-renewal and form clonal secondary spheres in culture [19,20]. Furthermore, chromosphere cells express increased mRNA levels of sympatho-adrenal and neuronal progenitor cell markers such as Nestin, Mash1, Vimentin, Musashi-1, as well as markers of neural crest cells (e.g. Sox1 and Sox10) [19,20,22]. Additionally, a significantly higher population of chromosphere-derived cells has been shown to acquire a dopaminergic phenotype and to extend projections as compared with CC [22].

Due to their favorable properties, chromospheres could represent a promissory source for cell replacement therapy in PD. Therefore, in this study we examined some of the molecular and functional properties of bovine-derived chromospheres *in vitro* and tested their effects following their grafting in the striatum of a rat model of PD.

## Materials and Methods

### Animals

Adult male Wistar rats (250–280 g) used in this study were kept under a 12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. Rats were obtained from the Institute's animal

facility. All animal procedures were carried out following protocols approved by the Committee of Animal Use and Care of the Instituto de Fisiología Celular (Permit number: RDC1114) from the Universidad Nacional Autónoma de México, which are based on national and international standards.

## CC- and chromosphere- culture

The cell culture protocol employed for chromosphere formation was described previously [20–22]. Adrenal glands from adult cattle were freshly obtained from the local slaughterhouse (“Rastro Frigorífico La Paz”, Los Reyes Acaquilpan, Mexico) and transported to the laboratory in ice-cold d-PBS buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with 2% penicillin/streptomycin solution. Prior to chromaffin and chromaffin progenitor-like cell isolation, adrenals were shortly put in 70% ethanol and connective tissue was removed. Adrenals were flushed several times with d-PBS through the central vein to remove any remaining blood. Next, d-PBS supplemented with 0.3% type II collagenase (Sigma-Aldrich) and 30 units/ml DNase I (Sigma-Aldrich) was injected through the central vein, and the tissue was then incubated at 37°C for 40 min, followed by a second injection and incubation for 20 min. Cells from the adrenal medulla were separated by mechanical dissociation, sieved through a ~300 µm chiffon two times, and then two more times through 100 and 70 µm cell strainers (Becton Dickson), and finally washed with d-PBS three times. Cells were then cultured in adherent culture flasks (Sarstedt) using DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 10% steroid-free FBS (Charcoal-Dextran treated, Hyclone) and 2% penicillin-streptomycin, and kept overnight in an incubator with humidified atmosphere (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. Afterwards, chromaffin and progenitor-like cells were separated from other cells types by differential plating as previously described [22]; briefly, cells were detached from the culture flasks and placed on a new adherent flask and incubated for 2 h, after which the supernatant containing the chromaffin and chromaffin progenitor-like cells was recollected and placed in a new adherent flask for 1 h, repeating this step one additional time. Finally, for chromosphere formation and expansion, isolated cells were seeded in ultra-low attachment culture flasks (Sarstedt) with Neurobasal medium (Gibco) containing 2% B27-supplement (Gibco), 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine (PAA laboratories) and 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma-Aldrich). For CC culture, after differential plating isolated cells were seeded in DMEM/F12 medium supplemented with 10% steroid-free FBS and 1% penicillin/streptomycin in adherent dishes. Fresh medium was added every two days.

## HPLC-ED measurements of *in vitro* catecholamine release

Three or 9 days after cell dissociation, CC and chromospheres were seeded at a density of 30,000 cells per well in 24-well plates previously treated with poly-L-Lysine (4 µg/ml) and laminin (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) to enhance cell adhesion, and incubated for 1 h in culture medium to allow the cells to adhere to the substrate. The culture medium was then substituted by 400 µl of physiological solution (140 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 1 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), and the cells were incubated for 5 minutes at 37°C in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) in the complete absence of light. The extracellular solution was recollected and supplemented with 0.01 M perchloric acid (HClO<sub>4</sub>) to avoid catecholamine oxidation. Samples were analyzed using HPLC with electrochemical detection (HPLC-ED). Calibration standard samples were diluted in the same physiological solution with 0.01 M perchloric acid. The mobile phase consisted of HPLC-grade water containing 0.15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM sodium octylsulfate and 12.5% (v/v) methanol. The pH was adjusted to 3.8 with 1 M perchloric acid. The mobile phase and samples

were filtered prior to use. 20  $\mu$ l of each sample were injected for analysis using a Rheodyne 734 auto injector (Gilson Inc, Middleton USA). ED was performed using an LC-3C detector (BAS) prototype (750 mV vs Ag/AgCl) glassy carbon electrode. The 305-Gilson pump provided a flow rate of 1 ml/min through the column (nucleosil 5 C18, ODS, 100A 150 x 4.6 mm) and guard column. The final concentration of catecholamines is expressed in nmol.

## 6-OHDA nigro-striatal lesion and cell transplantation

To generate a unilateral PD model, adult male Wistar rats (250–280 g body weight) were intraperitoneally (I.P.) anesthetized with ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively), and standard sterile-surgical and stereotaxic procedures were employed for 6-OHDA infusion [23]. Anesthetized animals were mounted on a stereotaxic device and normal saline solution (0.5  $\mu$ l total volume) supplemented with 40  $\mu$ g 6-OHDA and 0.02% ascorbic acid was injected into the left SNpc (- 4.7 mm AP,  $\pm$  1.6 mm ML, -8.2 mm DV, with respect to Bregma 0). For cell transplantation 18 days after 6-OHDA infusion, animals were anesthetized with ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively). Chromospheres or CC were re-suspended in Optimum medium (Gibco) to a density of  $\sim 3 \times 10^5$  cells in 4  $\mu$ l. The cells were injected into the left striatum (+ 1.0 mm AP,  $\pm$  3.0 mm ML, -5.3 (2  $\mu$ l) and -5.0 (2  $\mu$ l) DV, with respect to Bregma 0). Cyclosporine A (10 mg/kg) was orally administered daily until the end of the experiment, starting 1 day before cell transplantation. Once the injection of either 6-OHDA or cells was complete, the cannula was left in place for at least 5 min to prevent a back flow.

## Rotational behavior

To measure dopaminergic imbalance, animals were injected I.P. with amphetamine (4 mg/kg) or subcutaneously (S.C.) injected with apomorphine (2 mg/kg), as previously described [23]. The number of left and right turns was recorded for 90 min for amphetamine and 30 min for apomorphine using a custom-made computerized image- and movement- recognition system. Animals were evaluated one and two weeks after the 6-OHDA lesion and only those with  $> 500$  ipsilateral turns induced with amphetamine or  $> 300$  contralateral turns induced with apomorphine were used for the rest of the experiments, to ensure a high level of lesion. Grafted animals and their controls were evaluated 1, 2, 4, 6, 8 and 12 weeks post-grafting (wpg) or at equivalent times in those groups without grafts. Data is presented as the percentage of change in the number of turns after grafting relative to their initial turn number before grafting. For all the motor behavior experiments, excluding those used for analyzing the relation between graft survival and motor improvement, only grafted animals that showed a decrement  $\geq 10\%$  at 1 and/or 2 wpg were evaluated for the rest of the analyzed times.

## Beam-test for motor coordination

As previously described [24], animals were trained for 3 days to walk up 15° tilted 2 m long beams of various widths (24, 18, 12, 6 and 3 mm), which went from a starting platform up to the cage of the rats. Animals received a treat upon completion of the task during the learning period. Four days after the beginning of the training, before 6-OHDA infusion, animals were subjected to the beam test for the first time, which was followed by a second evaluation one week later. The test consisted in measuring the time it took the animals to walk from the base of the beam up to their cage at the end of the beam. Only those animals that were able to complete the test in less than 120 s during the two first evaluations were included in the experiment as either control groups or experimental groups. The values obtained from those two evaluations were set as the baseline. The test was repeated sequentially 5 times per animal, one repetition for each beam width. The order of the beams was randomly selected in each experiment.

The variables that were quantified for each rat were the “total time” the animals required to reach the cage, and the time during the test while animals remained immobile (i.e. “no-movement time” variable). Animals that required more than 120 s to complete the task, or that fell off the beams, were automatically assigned a total time and no-movement time of 120 s. Animals were evaluated two times after the 6-OHDA lesion, and only those with a deficient performance (i.e. a satisfactory level of lesion) were included in the experiment as either part of the 6-OHDA group, the 6-OHDA+ chromospheres group or the 6-OHDA + vehicle group. All animals were evaluated 1, 2, 4, 6, 8 and 12 wpg or at equivalent times in those groups without grafts.

## Immunostaining

As previously described [23], animals were I.P. injected with a terminal dose of sodium pentobarbital (60 mg/kg) and were transcardially perfused with 250 ml of 0.1 M phosphate buffer, followed by 250 ml ice-cold paraformaldehyde (4% w/v in 0.1 M phosphate buffer). The brains were removed and post-fixed for 12 h in 4% paraformaldehyde. Post-fixed brain tissue was cryoprotected by incubation in 10%, 20% and 30% sucrose for 24 h for each concentration. 40  $\mu$ m brain coronal sections were cut and collected in serial order and placed in 0.1 M phosphate buffer. Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 30 minutes.

The following primary antibodies were used: rabbit or mouse anti-TH (1:1000, EMD Millipore), rabbit anti-DBH (1:350, Abcam). Appropriate fluorescence-tagged (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or biotinylated (Vector Laboratories) secondary antibodies were used for microscopy visualization. For TUNEL labeling, we used the in situ cell death detection kit with TMR red (Roche), and followed the procedure for difficult tissues specified by the manufacturer.

To avoid unspecific binding, specimens were incubated for 1–2 h at room temperature in blocking solution composed of 0.1 M phosphate buffer, 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and either 3% normal serum (for fluorescence staining) or 2% albumin (for histochemistry staining). Specimens were incubated at room temperature in primary antibodies diluted in blocking solution. Fluorescence-tagged secondary antibodies were diluted in 0.1 M phosphate buffer and applied to the specimen for 2 h at room temperature. Biotinylated secondary antibodies were diluted in blocking solution for 2 h at room temperature. Detection of the primary-secondary biotinylated antibody complexes was achieved by peroxidase-driven precipitation of di-aminobenzidine (Sigma-Aldrich), previously amplified with streptavidin-biotin (Vector Labs). Di-aminobenzidine labelled specimens were dehydrated in alcohol and xylene.

## Microscopy

Specimens were examined on a Leica Confocal imaging system, an Olympus FV1000 Confocal microscope, a Leica epifluorescence microscope or a Leica EZ4D microscope. For image analysis we used the Image J software [25]. All images from each sample were acquired under the same conditions (exposure, brightness, gamma levels). For graft reconstructions the photographs were taken with a Leica Confocal imaging system, and the reconstruction was performed manually only for the site of the graft.

## Cell counting for *in vitro* experiments

Samples were obtained from three independent cultures. During each culture, every adrenal gland was treated as an independent sample. CC from separate samples ( $n = 6$ ) were directly seeded on treated-coverslips (poly-L-Lysine (4  $\mu$ g/ml) and laminin (5  $\mu$ g/ml)), whereas

chromospheres from independent samples ( $n = 3$ ) were first centrifuged and frozen to obtain cryo-sections of 20  $\mu\text{m}$ . For each sample, a z-stack of random high-resolution images were captured at 40x magnification to obtain representative images using an Olympus FV1000 microscope. We counted the number of cells that expressed TH, DBH or both and the total number of cells marked with DAPI to identify cell nuclei. The numbers of TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup> or TH<sup>+</sup>/DBH<sup>+</sup> cells were normalized to the total counted nuclei (50–300 nuclei were counted per image), and are expressed as percentages from the total number of cells present in the analyzed image.

### Estimation of the number of surviving grafted cells in the striatum

To count the number of surviving grafted TH<sup>+</sup> cells in the striatum, rat brains were extracted and sectioned as described earlier in the immunostaining section. Imaging analysis was done using the Image J software. The small size of the grafts (at 1, 2, 4 and 12 wpg) permitted its identification by TH immunostaining and the counting of all TH<sup>+</sup> cells in each coronal section series. The small size of the graft allowed us to avoid the need for stereological counting procedures, in agreement with similar studies by other authors [26–28]. We used one out of four serial sections for quantification (Fig 1a). In cases where the graft was too small in the antero-posterior axis (i.e. only two or three sections from the selected series contained graft), we used two out of four sections to corroborate the presence of the graft and, if necessary, we used all the recollected sections. The number of TH<sup>+</sup> cells inside the graft was manually quantified using z-stack images obtained with a 40x objective using confocal microscopy. Only TH<sup>+</sup> cells with visible and complete nuclei were counted and the counted cell numbers were corrected by using the Abercrombie method [29]. We estimated the total number of TH<sup>+</sup> cells in the striatal grafts for each animal by extrapolating the number of TH<sup>+</sup> cells counted in every fourth coronal section to the rest of the sections where we did not count cells directly.

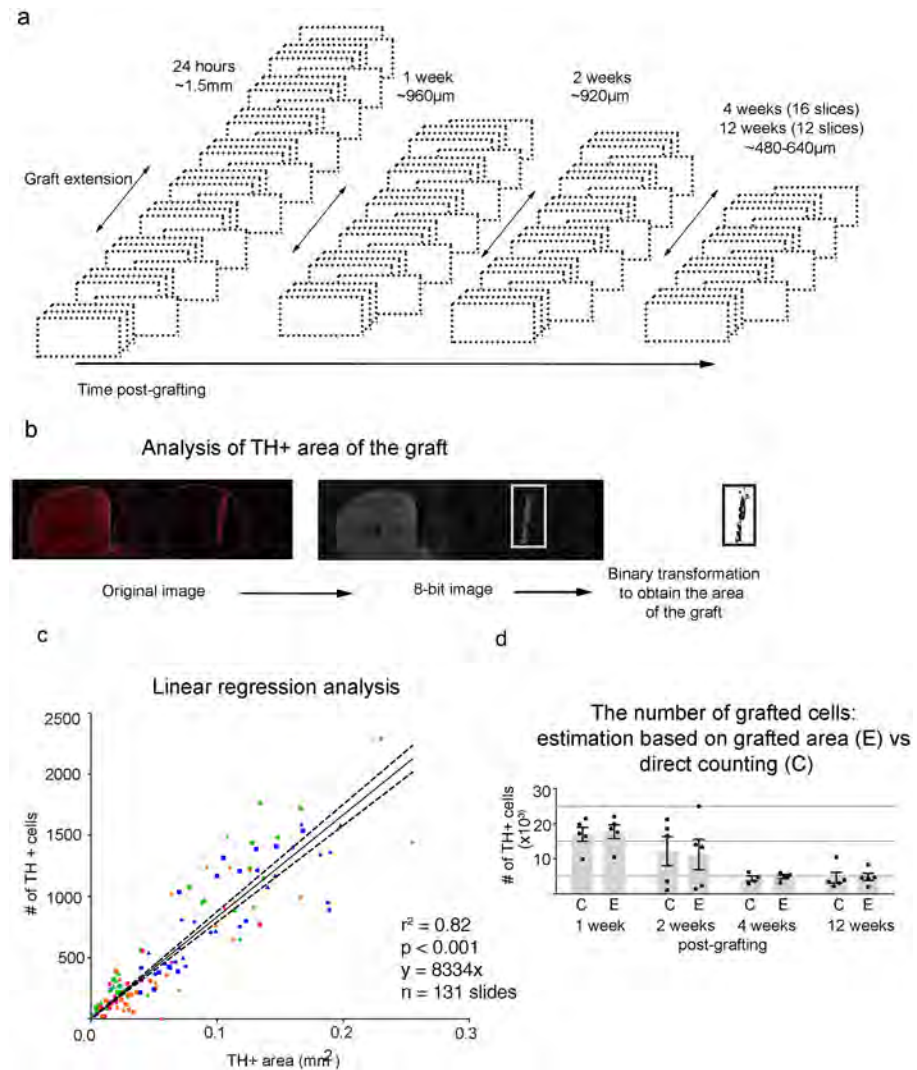
To validate the counting of TH<sup>+</sup> cells as an indicator of graft survival (24 h, 1, 2 and 4 wpg), we used a TH-independent method to confirm that the TH signal was from grafted cells. To do this, chromospheres cultured for 5 days were loaded with the green fluorescent molecule called CFSE (10  $\mu\text{M}$ , Life Technologies) following manufacturer's indications for cells in suspension. After 4 days, CFSE-loaded chromospheres were grafted as described previously.

In animals used for analysis of graft survival 24 h post-grafting the grafted cells were densely packed and the size of the graft was very large, making the direct counting of cells impractical. We therefore used a different method to estimate the number of surviving cells. This consisted in estimating the number of cells using the linear relation between the TH<sup>+</sup> area of the graft and the number of TH<sup>+</sup> cells counted directly (Fig 1c). We obtained the TH<sup>+</sup> area of the graft as follows: Reconstructions at 10x magnification were constructed using a Leica epifluorescence microscope equipped with an automatic platina. 10x reconstructions were converted first to 8-bit images and then to binary image files (Fig 1b, middle), which were then used to quantify the graft area using the area measurement function of ImageJ (Fig 1b, right). A plot of the TH<sup>+</sup> area versus the number of individually counted TH<sup>+</sup> cells for each striatal section from animals sacrificed at 1, 2, 4 and 12 wpg showed a good linear correlation (Fig 1c), indicating that the TH<sup>+</sup> area can be reliably used to estimate the number of cells of large grafts. To verify this, we compared the total number of grafted TH<sup>+</sup> cells for each grafted animal at 1, 2, 4 and 12 wpg determined by direct counting with the values obtained from our approximate method using the areas, and found that the obtained values were not statistically different (Fig 1d).

### Densitometry of dopaminergic fibers

The density of TH<sup>+</sup> fibers in the striatum was calculated as previously described [30], using three to four coronal brain sections from each rat. Striatal sections were processed for TH





**Fig 1. Estimation of chromosphere graft survival.** (a) One out of four of the total coronal sections of the striatum (represented by dotted squares) were selected for immunofluorescence staining for TH. The antero-posterior extension of the graft along the striatum was estimated by determining the number of coronal sections of the striatum in which grafted cells could still be visualized, as schematized in the figure. As time after grafting progressed, the number of slices with grafted cells became smaller, indicating an antero-posterior shrinking of the grafted area due to cell death. (b) Quantification of the TH<sup>+</sup> area of a graft. TH<sup>+</sup> immunofluorescence reconstructions of the striatum (left panel) at 10x magnification were transformed into 8-bit images (middle panel), followed by binary transformation (right panel) to easily quantify the total area of the graft in each striatal section using the area quantification option in ImageJ. The insert framed by a dotted white square in the middle panel highlights the region containing the graft over which we quantified the TH<sup>+</sup> area. (c) Graph of the estimated TH<sup>+</sup> area vs the number of TH<sup>+</sup> cells counted directly. Each data point represents the number of cells or the TH<sup>+</sup> area determined for a single coronal section. Data points from grafts evaluated at 1, 2, 4 or 12 wpg are shown in different colors. The solid line is the linear regression to the data, with parameters shown at the bottom right. The dotted lines denote the uncertainty of the linear fit. (d) Comparison of the estimation (denoted by letter E in the graph) of graft total cell number using the extrapolation of measured TH<sup>+</sup> area to the linear regression in (c) with the total number of TH<sup>+</sup> cells directly counted (denoted by C in the graph) shows that the approximate method yields very similar results to the direct method with no statistical differences (multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 0.0043$ ,  $p = 0.9480$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g001

immunohistochemistry as described above. Images were taken with a Leica EZ4D microscope with constant illumination and equal optical parameters were used for all acquired images. Digitized images were analyzed with ImageJ software. The data are presented as optical density (O.D.) values for each hemisphere. In cases where the O.D. of a lesioned striatum was higher than expected, we corroborated cell loss at the SNpc directly by counting TH<sup>+</sup> cell bodies in that brain structure.

## Statistics

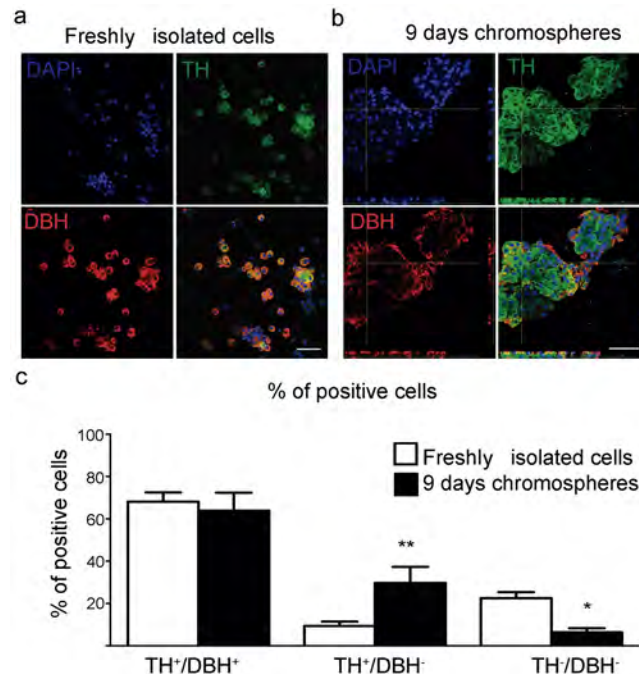
All group data are expressed as mean  $\pm$  SEM. All statistical analyses were conducted using Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). The tests used for each experiment are specified in each figure legend.

## Results

### Chromosphere formation in culture increases the number of dopaminergic cells and dopamine release

A necessary feature required for the use of a cell source in PD cell replacement therapy is the ability to efficiently release dopamine. Consistently, it has been demonstrated by other authors that chromosphere formation in culture increases mRNA levels for Tyrosine Hydroxylase (TH), the rate limiting enzyme for dopamine synthesis, contrary to CC in culture, which retain their predominantly adrenergic phenotype (mRNA expression of phenylethanolamine N-methyltransferase) [20–22]. We began by determining whether chromosphere formation in culture [20–22] increases the number of dopaminergic cells relative to cultured CC from adult bovine adrenal medulla. To do this, we performed double staining immunofluorescence to detect cells that express only TH (as a marker for dopaminergic cells), or TH together with dopamine-beta-hydroxylase (DBH) (as a marker for noradrenergic and adrenergic cells) in chromospheres cultured for 9 days compared with freshly isolated cells isolated from the adrenal medulla. Notably, freshly isolated cells are expected to be composed primarily of CC, as they are the major component of the cultures after differential plating and before inducing the formation of chromospheres. Chromosphere formation in culture was observed within 3 days, and exhibited the morphological properties previously described [20–22], including their aggregation and formation of large spheres. Consistent with the previous mRNA quantifications [20–22], chromosphere formation significantly increased the number of TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup> cells compared to freshly isolated CC (Fig 2a–2c), suggesting that a larger proportion of chromosphere cells acquire a dopaminergic phenotype.

We next proceeded to investigate whether the increase in TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup> cells in chromospheres is accompanied by an increment in basal dopamine release relative to noradrenaline and adrenaline, and also relative to CC cultured for either 3 or 9 days. To do this, we incubated equal numbers of chromosphere cells or CC in physiological solution for 5 minutes, recollected the supernatant and analyzed the catecholamine content using HPLC-ED. For CC, adrenaline release increased significantly (~ 4-fold) between 3 and 9 days of culture (Fig 3a), while noradrenaline did not show a significant increment. In contrast, under the cell culture conditions employed for chromosphere formation, both adrenaline and noradrenaline release was similar to that of 3 days CC but adrenaline was significantly lower than that of 9 days CC (Fig 3a). On the other hand, both 9 days chromospheres and 9 days CC released significantly higher amounts of dopamine compared with 3 days CC (up to 10-fold increase in both 9 days chromospheres and CC, Fig 3b), but no significant difference in total dopamine release was found between 9 days CC and 9 days chromospheres (Fig 3b). However, the percentage of dopamine



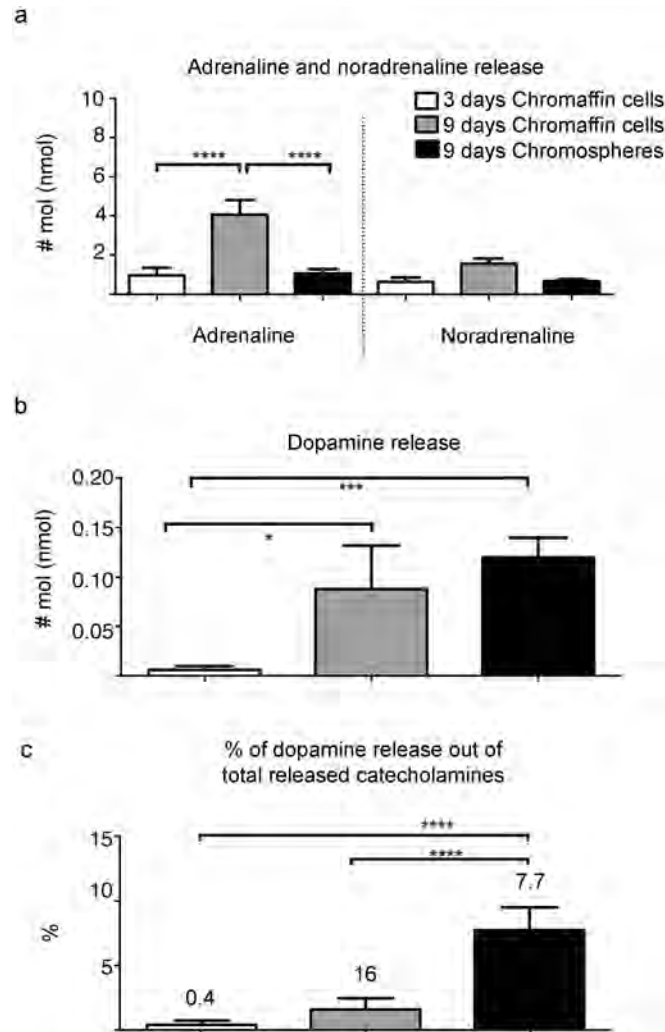
**Fig 2. *In vitro* analysis of the number of TH<sup>+</sup> cells in chromospheres and CC.** (a-b) Confocal microscopy photographs showing double-immunofluorescence staining for TH (green, top right panel) and DBH (red, bottom left panel) in freshly isolated cells (a) and 9 days-chromospheres (b). Nuclei are marked with DAPI (blue, top left panel). Channels are shown separately and the merge of the three channels is shown at the bottom right panel. For chromosphere-slices (b) an orthogonal view is shown (xyz). Scale bar is 100  $\mu$ m. (c) Percentages of the number of cells that expressed TH together with DBH (TH<sup>+</sup>/DBH<sup>+</sup>), TH only (TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup>), and cells only marked with DAPI (TH<sup>-</sup>/DBH<sup>-</sup>). The percentages were calculated relative to the total number of counted nuclei. Error bars are the SEM and the mean was obtained from three independent cultures with a total of six coverslips with fixed-freshly isolated cells or three slides with fixed-chromospheres sections. Statistically significant differences were observed for TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup> chromospheres cells (29.71  $\pm$  7.635%) compared to freshly isolated cells (9.363  $\pm$  2.083%) and for TH<sup>-</sup>/DBH<sup>-</sup> chromospheres (6.410  $\pm$  1.937%) compared to freshly isolated cells (22.50  $\pm$  2.9%) (multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ;  $F = 71.21$ ,  $DF = 2$ ,  $p < 0.0001$ , followed by Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test,  $p = 0.0057^{**}$  for TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup> and 0.0128\* for TH<sup>-</sup>/DBH<sup>-</sup>).

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g002

out of the total catecholamines released (adrenaline + noradrenaline + dopamine) was significantly higher in 9 days chromospheres, representing a 7.7% of the total of catecholamines, as opposed to a 1.6% in 9 days CC and 0.4% in 3 days CC (Fig 3c). Together, these results indicate that the cell culture employed for chromosphere formation maintains the initial levels of adrenaline and noradrenaline, whereas dopamine release is promoted. In contrast, CC increased both their release of adrenaline and dopamine.

### Motor behavior in 6-OHDA-lesioned rats transplanted with chromospheres

We next tested the ability of chromosphere-grafts to improve the motor alterations in 6-OHDA-lesioned animals versus non-grafted animals. In rodents, unilateral administration of 6-OHDA into the SNpc produces dopaminergic neuronal death exclusively in the brain hemisphere where the toxin was administered, providing a widely used model to study the motor symptoms of PD associated with dopamine loss in the striatum. Animals treated with 6-OHDA were grafted with chromosphere-derived cells into the lesioned-dorsal striatum 18 days after the lesion. Since a large majority of cultured chromospheres expressed TH (94  $\pm$  2%), we

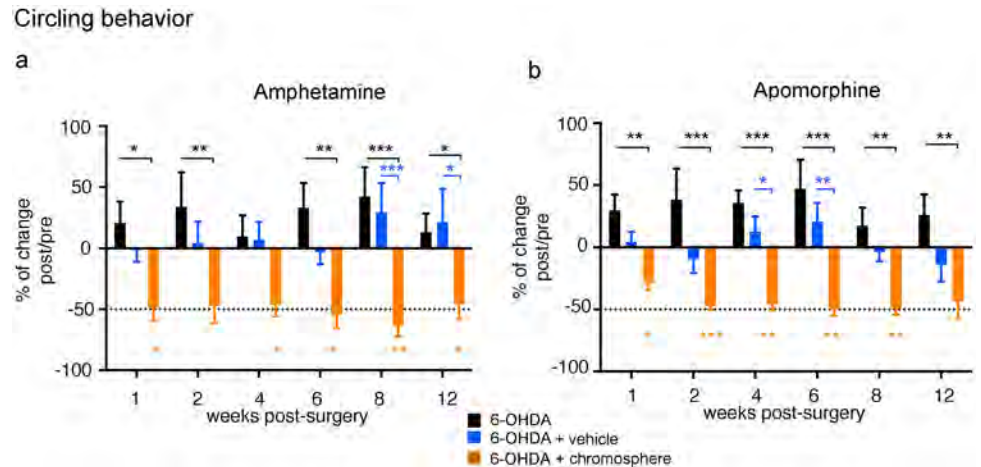


**Fig 3. *In vitro* analysis of noradrenaline, adrenaline and dopamine release in chromospheres and CC.** (a-b) Adrenaline, noradrenaline and dopamine release under basal conditions was determined by HPLC-ED in 3- and 9- days cultured-CC and 9 days cultured-chromospheres. 3 days CC and 9 days chromospheres were obtained from 8 independently processed adrenal glands, whereas 9 days CC were obtained from 3 independently processed adrenal glands. Data collection and analysis from cells obtained from different glands was also done separately. The extracellular medium was recollected for quantification of released catecholamines. Catecholamine quantities are expressed in nmol. (a) Significant differences were observed for adrenaline (3-days CC:  $0.9726 \pm 0.3828$  nmol; 9-days CC:  $4.057 \pm 0.7481$  nmol; 9-days chromospheres:  $1.065 \pm 0.2261$  nmol; multivariate ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $F = 17.36$ ,  $DF = 2$ ,  $p < 0.0001$ ; followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.0001$ \*\*\*\*) and (b) dopamine (3 days CC:  $0.0058 \pm 0.0038$  nmol; 9 days CC:  $0.087 \pm 0.043$  nmol; 9 days chromospheres:  $0.12 \pm 0.019$  nmol; ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $F = 12.53$ ,  $r^2 = 0.6103$ ,  $p = 0.0005$ ; followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test,  $p = 0.0145$ \* and  $p = 0.0004$ \*\*\*). (c) Graphic representation of the percentage of dopamine released relative to the total catecholamines released (adrenaline + noradrenaline + dopamine). Significant differences were observed between 9-days chromospheres compared to 9 and 3 days CC (ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $F = 27.42$ ,  $r^2 = 0.7231$ ,  $p < 0.0001$ ; followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.0001$ \*\*\*\*).

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g003

used TH immunostaining to determine the location and the size of chromosphere grafts in the experiments that will follow.

Amphetamine stimulation of animals lesioned unilaterally with 6-OHDA promotes dopamine release from all dopaminergic terminals of the non-lesioned side, inducing a stereotypical



**Fig 4. Effects of chromosphere-grafts on amphetamine and apomorphine induced circling behavior in 6-OHDA lesioned rats.** (a) Amphetamine- and (b) apomorphine- induced circling behavior was evaluated in three groups at different times: 6-OHDA-lesioned ( $n = 6$  for amphetamine and  $n = 6$  for apomorphine, black), 6-OHDA+vehicle ( $n = 6$  for amphetamine and  $n = 6$  for apomorphine, blue) and 6-OHDA +chromosphere grafts ( $n = 7$  for amphetamine and  $n = 6$  for apomorphine, orange). For all 6-OHDA-treated animals, the number of turns after the lesion measured in the two evaluations previous to the start of the experiment (7 and 14 days after 6-OHDA administration) were used as reference point to calculate the percentage of change in the number of turns after surgery (starting at 7 days after grafting surgery). “Weeks post-surgery” denotes the time elapsed since chromospheres were surgically implanted in the test group, which was used as reference also for all other control groups. Each bar represents the mean of the percentage of change in turn number for each evaluation. The dotted horizontal line denotes a reduction in turn number of 50%. Significant differences were observed between the number of turns before and after grafting (orange asterisks) for both amphetamine-induced rotations (repeated measures ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 7.086$ ,  $DF = 6$ ,  $r^2 = 0.5415$ ,  $p = 0.0035$ ; followed by Dunnett’s multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^*$  and  $p < 0.01^{**}$ ) and apomorphine-induced rotations (repeated measures ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 9.03$ ,  $DF = 6$ ,  $r^2 = 0.569$ ,  $p = 0.0128$ ; followed by Dunnett’s multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Also the change in turn number in the grafted group was significantly higher than in the lesioned group without graft (black asterisks) and vehicle group (blue asterisks) for both amphetamine-induced rotations (repeated measures multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 6.991$ ,  $DF = 23$ ,  $p < 0.0001$ ; followed by Tukey’s multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ) and apomorphine-induced rotations (repeated measures multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 10.36$ ,  $DF = 2$ ,  $p = 0.0017$ ; followed by Tukey’s multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g004

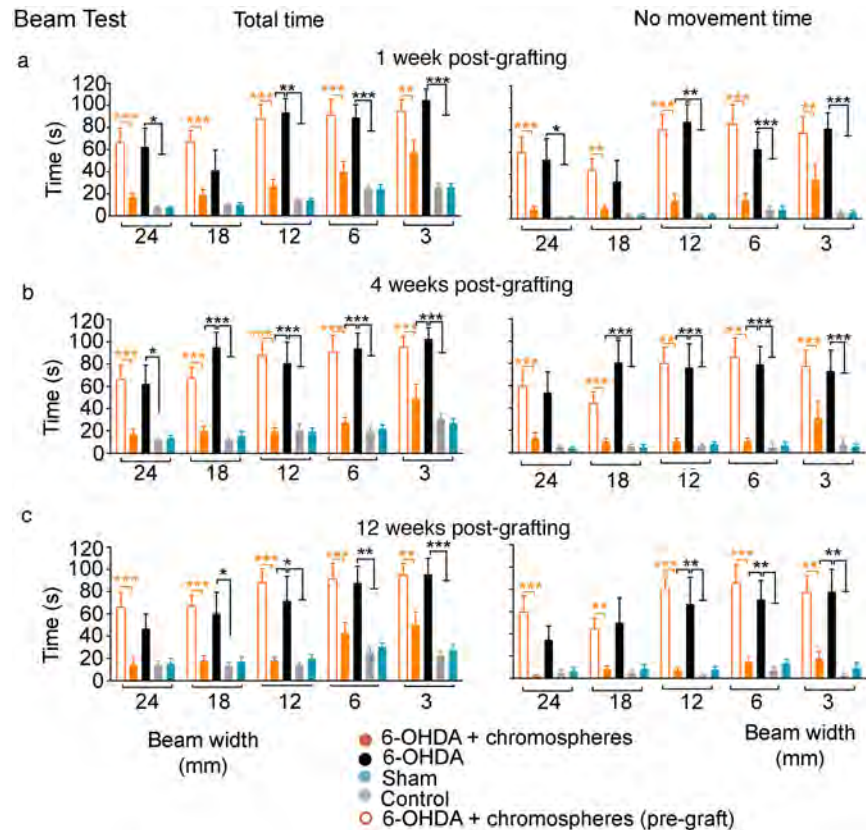
rotation movement ipsilateral to the dopamine-depleted hemisphere. Therefore, grafted cells are expected to reduce turning-behavior by releasing dopamine in the lesioned side. The control ( $n = 6$ ) and sham animals ( $n = 6$ ) showed no rotational behavior (data not shown), whereas the 6-OHDA-treated ( $n = 6$ ) group showed a stable rotational behavior (Fig 4a and S1 Fig). In contrast, seven out of 12 grafted animals showed a reduction (i.e. a decrement  $\geq 10\%$ ) in turn-number during the first two evaluations, which persisted in some cases for at least 3 months after grafting (Fig 4a, orange asterisks and S1 Fig). The five animals that did not show any improvement during the first two evaluations were sacrificed and were found to contain no traces of a surviving graft, as detected by TH-immunostaining, suggesting that graft survival is required for motor improvement. The highest percentage of reduction in turn-number found was 63% at 8 weeks post-grafting (wpg), with an average decrement of 51% throughout the 3 months, with a statistically significant decrement during all the evaluations (except for 4wpg) compared with the non-grafted lesioned animals (Fig 4a, black asterisks). To verify that this effect on the behavior was due to the grafted cells, and that immunosuppression and/or the vehicle administered had no effect, one additional group was added in which lesioned animals were immunosuppressed and vehicle was administered instead of chromosphere cells

(6-OHDA+vehicle,  $n = 6$ ). This group showed no changes in motor behavior relative to its performance before grafting and to the lesioned animals without grafts (Fig 4a and S1 Fig), confirming that the motor improvement observed in grafted animals originates from the transplanted cells.

Amphetamine-induced circling behavior is used as an indirect indicator of induced dopamine release by the grafted cells. However, that chromosome cells can release dopamine upon stimulation by amphetamine does not indicate whether dopamine is released under basal conditions. An indirect assay to test basal dopamine release is the quantification of the turning behavior after stimulation with apomorphine, a dopamine receptor agonist. Apomorphine induces rotations contralateral to the lesioned side as a result of a sensitization of the dopamine receptors on the side lacking dopaminergic input. Thus, basal dopamine released from the grafted cells is expected to reverse sensitization and reduce the turning-behavior. Notably, six out of 10 grafted animals in apomorphine-induced rotations showed a reduction  $\geq 10\%$  in turn-number during the first two evaluations, compared with their number of turns before grafting (Fig 4b). The animals that presented no motor improvement in the first two evaluations were sacrificed, and shown to have no surviving TH<sup>+</sup> cells. In the rest of the grafted animals the improvement persisted for at least 3 months (Fig 4b orange asterisks, and S1 Fig), although one animal was also sacrificed after 4 wpg because of an ear infection. The highest percentage of reduction in turn-number found was 50% after 6 wpg, with an average decrement of 41% during the 3 months with a statistically significant decrement during all the evaluations compared with the non-grafted animals (Fig 4b, black asterisks), and during some evaluations compared with the 6-OHDA+vehicle (Fig 4b, blue asterisks).

So far, our results with pharmacological behavioral tests show that surviving grafted chromosome cells produce a motor improvement in the 6-OHDA model of PD, possibly by releasing dopamine. We next tested the ability of the grafts to generate motor improvements in a non-pharmacological test, which would more closely reflect the conditions where chromosomes are expected to work in the context of a PD patient. We therefore evaluated the recovery of motor alterations with the beam test, a test that measures motor coordination in terms of the total time it takes the animals to climb up tilted beams of different widths, with increasing task time denoting a poorer coordination [24]. The decrease in coordination can also be detected in the test as an increase in the time during which the animals remain immobile (i.e. 'no movement time' variable) [24]. During the first two weeks, we observed a reduction in the total time variable in eight out of 11 grafted animals relative to their evaluations before grafting. The three animals that presented no motor improvement were sacrificed and shown to have a negligible level of surviving TH<sup>+</sup> cells. For the rest of the evaluations we observed a statistically significant reduction in the total time in all the evaluations of 6-OHDA+chromospheres animals ( $n = 8$ ) compared with their performance before grafting (Fig 5 and S2 Fig, orange asterisks). The observed improvement persisted for at least 3 months after grafting and no differences were observed when compared to control and sham groups (Fig 5c). The 6-OHDA group ( $n = 7$ ) showed more difficulties to perform the test over the 3 months of evaluation (Fig 5 and S2 Fig), whereas the grafted animals presented a clear reduction in the total time and no movement time that was statistically significant in some evaluations when compared with lesioned animals without graft (Fig 5 and S2 Fig, black asterisks). These data suggest that animals with surviving chromosome grafts improve their motor coordination evaluated with a non-pharmacological test.

In the three behavioral tests, we found that the grafted animals that did not present an improvement in the first two evaluations, which we used as exclusion criterion, had negligible levels of graft survival. To validate the hypothesis that the grafts are responsible for the observed motor improvement in the animals included in the experiment, we performed a



**Fig 5. Motor performance during the beam test at 1, 4 and 12 weeks post-grafting.** (a-c, left) The total time (seconds) that the animals took to complete the test and (a-c, right) the time during which the animals remained immobile (no-movement time) while the test was on-going were measured in four different groups. The performance of each animal was evaluated in all beam widths (3, 6, 12, 18 and 24 mm) in each experimental trial. The following groups were included in the experiment: control (n = 8, gray), Sham (n = 8 blue), 6-OHDA (n = 7, black), 6-OHDA + chromosphere grafts (n = 8, orange). Evaluations in all groups were carried out periodically for 3 months after the grafting surgery in the test group. Only the evaluations obtained after 1-week, 4-weeks and 12-weeks post-grafting are shown, the rest of the evaluations (2, 6 and 8 wpg) are shown in [S2 Fig](#). Empty orange bars are the measurements from the grafted animal group obtained after the 6-OHDA-lesion procedure but before grafting. Significant differences were observed between the total time and no movement time measured before grafting compared with the total time and no movement time of the same group after grafting (orange asterisks) (repeated measures multivariate ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $F = 5.349$ ,  $DF = 4$ ,  $p = 0.0018$ ; followed by Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Also, significant was the difference in some evaluations in both the total and no movement time between 6-OHDA lesioned animals without graft and 6-OHDA lesioned animals with chromospheres, control and sham groups (black asterisks) (repeated measures multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 36.17$ ,  $DF = 7$ ,  $< 0.0001$ ; followed by Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^{*}$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Error bars are the SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g005

histological analysis in all animals used in the behavioral experiments to test for both dopaminergic denervation in the lesioned striatum and for survival of the grafted cells at 12 wpg. The analysis showed that for the three behavioral tests, all animals that presented a robust and consistent motor improvement also had surviving grafted TH<sup>+</sup> cells in the striatum, whereas animals that did not show a consistent improvement had no surviving grafts (see [Table 1](#), top panel, as summary of the behavioral results together with the percentages of motor improvement and the degree of graft survival for all experimental animals used for behavioral evaluation).

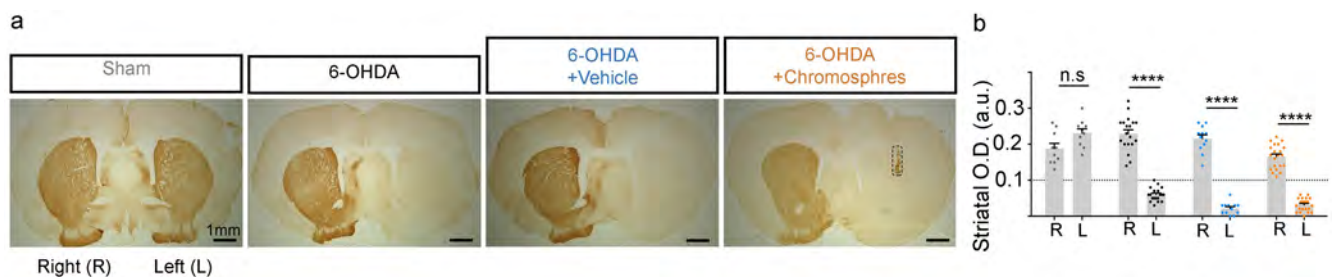
**Table 1. Survival and motor efficacy of chromosphere cell grafts.**

Experiment	No. of animals at the beginning of the experiment (A)	No. of animals with motor improvement during the first 2 weeks (B)	% of motor efficacy $[(B \times 100) / A]$	No. of animals with graft at the end of the experiment (C)	% of survival efficacy $[(C \times 100) / A]$
1. Circling behavior	12 and 10	7 and 6	59	5 and 3	36
2. Beam Test	11	8	73	6	55
<b>Total (1 and 2)</b>	33	21	77	14	42
3. Relation between survival and motor improvement	13	6	46	8	62
<b>Total (1–3)</b>	46	27	59	22	47

This table is a summary of the motor and survival efficacy of chromosphere grafts obtained from all the experiments performed where motor behavior was evaluated. The percentage of motor efficacy  $[(B \times 100) / A]$  was calculated as the number of animals with motor improvement during either 1 or 2 wpg (B) from the number of animals originally grafted (A). The percentage of survival efficacy  $[(C \times 100) / A]$  was calculated as the number of animals with surviving grafted cells at the end of the experiment (C) from the number of animals originally grafted (A).

doi:10.1371/journal.pone.0160854.t001

The results observed in the behavioral tests suggests that surviving chromosphere grafts induce motor improvement. However, the motor improvement observed could be the result of a partial rather than a complete loss of dopaminergic terminals in the lesioned striatum. To rule this out, we determined using TH immunohistochemistry the O.D. of striatal TH<sup>+</sup> fibers in both hemispheres for all the lesioned animals assayed in behavioral experiments, excluding the TH<sup>+</sup> area derived from the graft in transplanted animals (Fig 6a). We found that the degree of dopaminergic fiber loss in the lesioned striatum was similar in all the analyzed groups treated with 6-OHDA, corresponding to a severe dopaminergic denervation of the terminals in the striatum, and no significant differences were found between any of the lesioned experimental groups (Fig 6b). Thus, the recovery observed in the behavioral tests is consequence of the grafted cells rather than a lower difference in the degree of the lesion induced by the neurotoxin. Moreover, the lack of TH<sup>+</sup> staining in the lesioned striatum of grafted animals also indicates that the grafts did not produce a motor recovery by promoting sprouting of surviving dopaminergic terminals from the host. Together, our results suggest that grafted chromospheres could release dopamine and



**Fig 6. Density of dopaminergic fibers in the striatum of all animals used for long-term behavioral evaluations.** The degree of dopaminergic denervation in the striatum was measured to corroborate the effective destruction of the dopaminergic terminals. (a) Representative photographs of TH immunohistochemistry in striatal coronal sections obtained with a stereo-microscope for the experimental and control groups denoted in the figure. (b) Optical density of TH<sup>+</sup> signal for the two hemispheres was determined separately from three striatal sections per animal for all the animals used in the long-term behavioral experiments described thus far (i.e. those evaluated up to 12 wpg). The data in the graph correspond to the following experimental groups: Sham (n = 10 randomly selected animals, gray dots), 6-OHDA (n = 19, black dots), 6-OHDA + vehicle (n = 12, blue dots), 6-OHDA + chromospheres (n = 21, orange dots). For animals with chromosphere grafts, we excluded from the densitometry analysis the TH<sup>+</sup> area that corresponds to the graft (a, indicated by a dotted box). R, right hemisphere; L, left hemisphere. Significant differences were observed only between the lesioned (left) and non-lesioned (right) hemispheres in animals treated with 6-OHDA (multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 27.89$ ,  $DF = 6$ ,  $p < 0.0001$ ; followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test,  $P < 0.0001$  \*\*\*\*). Error bars are the SEM. Scale bar is 1 mm.

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g006



possibly other molecules (e.g. noradrenaline and adrenaline) under basal conditions and after pharmacological stimulation, and that these released molecules influence the striatal circuit to promote a motor recovery.

### Survival and TH expression of chromospheres grafted in a 6-OHDA rat model of PD

Given the variability in graft survival observed from the previous assays, we decided to directly quantify the capacity of chromosphere-grafts to survive in host animals as a function of time while using an additional detection method that is TH-independent. This is especially important since our previous assays were limited to the detection of TH<sup>+</sup> cells as an indicator for graft survival. Animals treated with 6-OHDA were grafted with chromosphere-derived cells previously loaded with the fluorescent dye CFSE (n = 26, Table 2, top panel). The CFSE molecules allowed us to corroborate that the observed TH<sup>+</sup> cells were transplanted cells instead of endogenous cells, as the CFSE-containing cells were clustered tightly in a region consistent with the location of the graft and also co-localize with TH (Fig 7b). TH<sup>+</sup> cells were quantified in independent groups of grafted animals sacrificed at 1, 2 or 4 wpg (for short-term evaluation). We also included five randomly selected animals (from those with surviving cells at 12 wpg) from the 3 month-behavioral experiments described above to compare survival at 12 wpg with survival at earlier time-points. The grafted area was easily detected in the dorsal striatum by the presence of TH<sup>+</sup> cells (and CFSE for the groups sacrificed at 1, 2 or 4 wpg) (Fig 7b), indicating the survival of the cells. Of the total grafted animals, 19 out of 26 showed CFSE or TH<sup>+</sup> cells in the grafted area (Table 2, top panel). We proceeded to estimate the number of surviving TH<sup>+</sup> cells in those animals with a detectable graft. In serial sections of the striatum of grafted animals, the grafts were found to extend across 8 to 64 slices (Fig 7c) of the host striatum, which is equivalent to a cross-section of 0.6–1.5 mm of the host striatum. Importantly, the number of slices in which the graft could be visualized decreased with the time after grafting, indicating a progressive reduction in the number of grafted cells. The presence of TH<sup>+</sup> cells

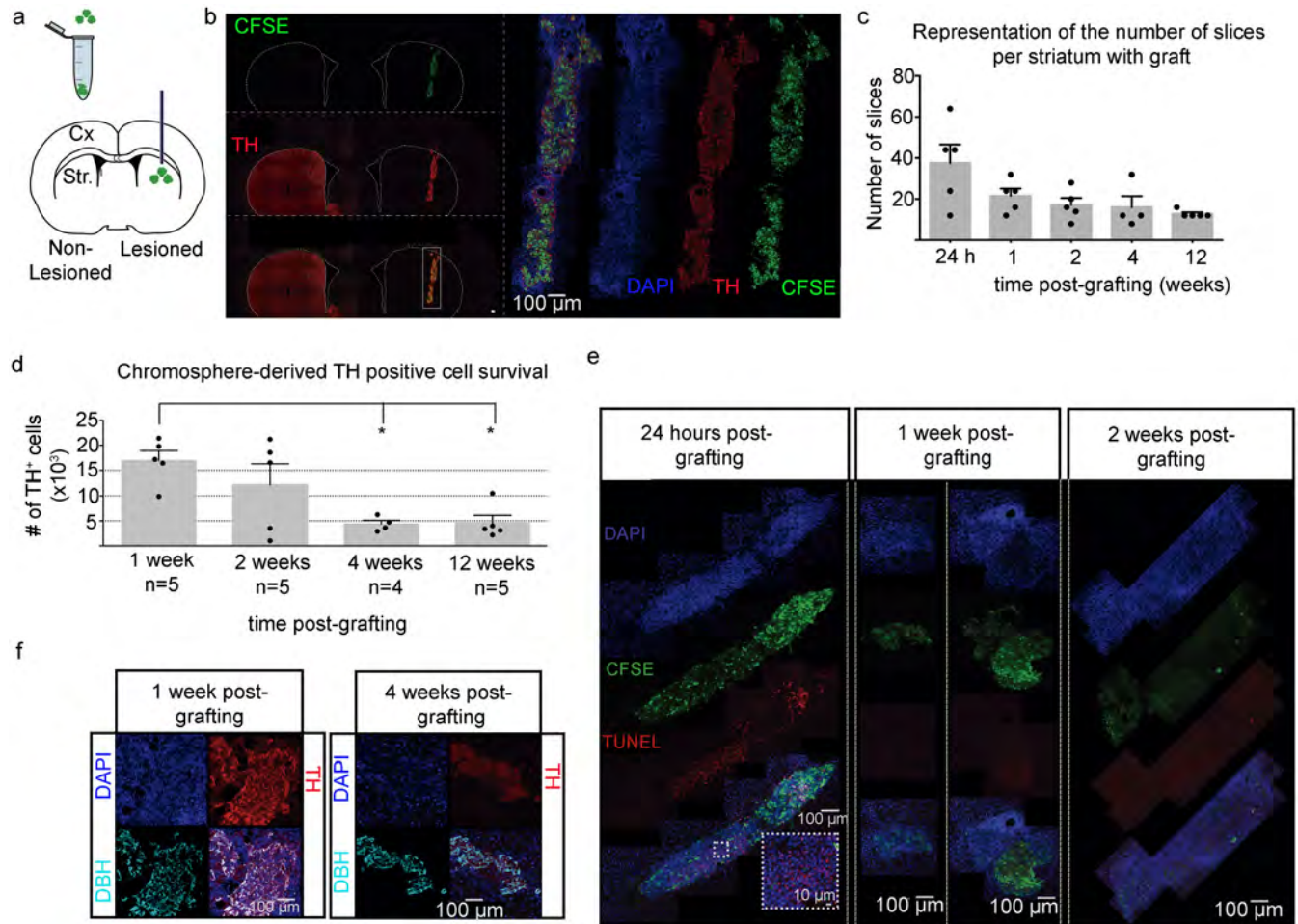
**Table 2. Survival efficacy of chromosphere cell grafts.**

Experiment	No. of animals at the beginning of the experiment (A)	No. of animals with graft at the end of the experiment (B)	% of survival efficacy ([B x 100] / A)	Decrement of TH <sup>+</sup> cells grafted compared with the initial number of grafted cells (%)
<b>Survival</b>				
24 h	6	5	83	84
1 wpg	7	5	71	94.3
2 wpg	7	5	71	95.9
4 wpg	6	4	67	98.5
<b>Total</b>	26	19	73	
<b>Behavior (circling behavior and beam test)<sup>a</sup></b>				
12 wpg	33	14	42	98.5
<b>Relation between survival and motor improvement<sup>a</sup></b>				
4 wpg	13	8	62	
<b>Grand Total</b>	72	41	57	

This table is a summary of the survival efficacy of chromosphere grafts obtained from all the experiments performed. The percentage of survival efficacy ([B x 100] / A) was calculated as the number of animals with surviving grafted cells at the end of the experiment (B) from the number of animals originally grafted (A). The percentage of decrement of TH<sup>+</sup> cells in the graft was determined only for the animals in the top and middle panels. We used the initial estimated number of grafted cells (~3 x 10<sup>5</sup> cells) to calculate the percentage of decrement in surviving cells at 1, 2, 4 and 12 wpg.

<sup>a</sup>These data is from animals used to evaluate motor behavior (Table 1).

doi:10.1371/journal.pone.0160854.t002



**Fig 7. Survival and TH expression of chromospheres grafted into the striatum of 6-OHDA lesioned rats.** (a) Schematic representation of the grafting site. Chromosphere cells were loaded with a green fluorescent dye (CFSE) before grafting, and stereotactically implanted into the lesioned striatum (Str). Cx (cortex). (b, left panel) Representative reconstruction of a coronal section of the striatum from a 6-OHDA-lesioned animal with grafted chromospheres after immunofluorescence staining for TH (red). Both lesioned (right) and non-lesioned (left) hemispheres are shown. The top panel shows CFSE fluorescence (green), the middle panel shows TH immunofluorescence and the lower panel is the merge. Images at 10x magnification were obtained with an epifluorescence microscope. The reconstruction was done automatically using an automatic platina. The scale bar is 100  $\mu$ m. (b, right panel) Representative reconstruction at higher magnification (40x) of a chromosphere graft obtained from the same coronal section as in the left panel using a confocal microscope. The reconstruction was done manually. DAPI (blue), TH immunostaining (red) and CFSE (green) are shown in separate channels and are merged in the top-left panel. (c) The number of coronal sections of the striatum found to contain grafted cells for each animal decreases during the first 24 h post-grafting. Striatal coronal sections of 40  $\mu$ m were recollected in serial order and every fourth section was used for TH immunostaining or every two sections for those cases where the graft was smaller along the antero-posterior axis. 24 h (n = 5); 1, 2, 12 wpg (n = 5); 4 wpg (n = 4). (d) The TH<sup>+</sup> surviving-grafted cells were counted directly from images obtained with 40x objective at 1, 2, 4 and 12 wpg (values obtained: 16 955  $\pm$  1 978, 12 195  $\pm$  4 129, 4 391  $\pm$  729, 4 639  $\pm$  1 497, respectively). Statistical differences are denoted by asterisks (ANOVA, P > 0.05, F = 5.685, r<sup>2</sup> = 0.5321, p = 0.0083; followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test, P < 0.05\*). (e) Representative confocal microscopy reconstructions showing grafted apoptotic cells marked with TUNEL (red) in coronal slices of the grafted striatum of animals at 24 h, 1 or 2 wpg. Grafted cells are shown in green as detected by CFSE fluorescence, and DAPI is shown in blue. The lower panel shows the overlay. All images were acquired using the same microscope settings and a 40x objective. Reconstructions of the grafted area were performed using a confocal microscope as described in (b). The insert framed by a dotted white square was obtained at 63x magnification from the section denoted by the dotted square in the image at lower magnification. (f) Representative double-immunofluorescence staining for TH (red) and DBH (cyan) in coronal sections from the striatum of two grafted animals at 1 and 4 wpg.

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g007

was restricted to the region of the graft, and no processes were found outside this region. Additionally, contrary to the *in vitro* assays where 26% of the analyzed cells showed a dopaminergic phenotype (TH<sup>+</sup>/DBH<sup>-</sup>), here almost all TH<sup>+</sup> cells were also positive for DBH (Fig 7f), suggesting a predominantly adrenergic/noradrenergic phenotype.

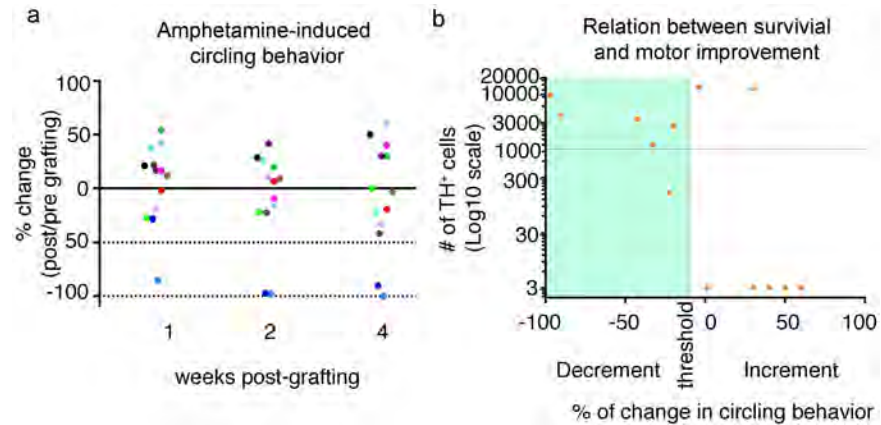
The total number of TH<sup>+</sup> cells was only significantly smaller at 4 and 12 wpg when compared with 1 wpg (Fig 7d). However, the data shows that the percentage of decrement in TH<sup>+</sup> cells between 1 wpg and 2 wpg was about 29%, followed by a 64% of decrement between 2 wpg and 4 wpg. No additional significant loss was observed between 4 and 12 wpg. These data suggest that cellular death is more prominent during the first weeks after transplantation, so that one additional group was added to estimate the number of TH<sup>+</sup> cells 24 h after grafting. In this group we estimated that the number of TH<sup>+</sup> cells was about  $48 \pm 12 \times 10^3$  (S3 Fig), which is much higher than the number of surviving cells even at 1wpg. These data indicate that the highest decrement of TH<sup>+</sup> cells occurred during the first 24 h post-grafting, with a decrement of 84% from the initial  $3 \times 10^5$  chromosphere-derived grafted cells (Table 2, top panel). We finally corroborated the cell death was more prominent in the first week after grafting by using TUNEL labeling to determine the apoptotic cellular death in the short-term (24 h post grafting, 1 and 2 wpg), and found more intense TUNEL labeling 24 h post grafting as compared to samples obtained from brains at 1 or 2 wpg (Fig 7e).

### Chromosphere-cell survival is not the only requirement for improving motor alterations

Our findings in the behavioral experiment showing that graft survival within the first weeks after transplantation was determinant for observing motor improvement indicates that the grafts are required for establishing a functional effect. However, our exclusion protocol for these experiments prevented us from directly comparing the relation between graft survival and motor recovery over a longer period of time for all the animals that we grafted, regardless of whether they presented an improvement in the first two evaluations. In an effort to directly assess the relation between survival and motor recovery over a longer period of time, we transplanted an independent group of lesioned animals and determined the decrement in amphetamine-induced circling behavior at 1, 2 and 4 wpg. At the end of the experiment (4 wpg) animals were sacrificed to determine the survival of TH<sup>+</sup> cells to correlate this data with the behavioral results. At 1 and 2 wpg six out of 13 animals decreased their number of turns by  $\geq 10\%$  compared with their number of turns before grafting. However, only four of those animals maintained the motor improvement until 4 wpg. Two additional animals exhibited decreased turn number only at 4 wpg (Fig 8a). Thus, a total of six animals reduced their turn number at the end of the experiment, from which four animals showed a high level of graft survival, with  $2.6$  to  $9.5 \times 10^3$  TH<sup>+</sup> cells, and the other two animals presented 1 208 and 160 surviving cells (Fig 8b). On the other hand, five out of seven of the animals that did not show any motor improvement presented a negligible level of graft survival (Fig 8b), consistent with our previous observations (Table 1). However, it is important to note that two animals that did not show any motor improvement had more than  $12 \times 10^3$  TH<sup>+</sup> cells, which is comparable to the graft survival observed in the animals with robust and consistent motor improvement (Fig 8b). This important observation indicates that cell survival is not the only requirement for inducing motor improvement.

### Comparison between chromosphere- and chromaffin-grafts in a 6-OHDA rat model of PD

So far, we have shown that in some grafted animals chromosphere cells are able to survive and to produce from moderate to robust motor improvements in both pharmacological and non-pharmacological behavioral tests. We have also shown that survival is necessary to produce improvement, but is not the only factor determining graft functionality. Given the progenitor-like properties of chromospheres [19–22], we were interested in determining whether they

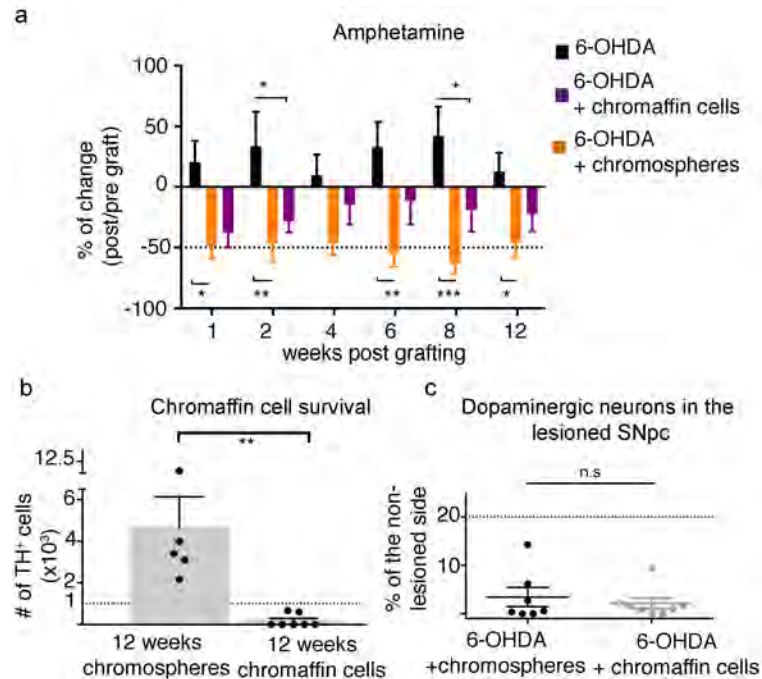


**Fig 8. Relation between chromosphere survival and motor improvement.** Amphetamine-induced circling behavior was used to determine whether there is a relation between chromosphere survival and reduction in turn number in grafted animals. (a) Percentage of change in amphetamine induced circling behavior in 6-OHDA-lesioned animals grafted with chromospheres. Each animal is represented by a different dot color. The percentage of change was calculated using the initial number of turns for each 6-OHDA-treated animal before grafting as reference, so that negative values denote a decrease in the number of turns, whereas positive values denote an increase. The dotted horizontal lines denote a reduction in turn number of 50% and 100%. At the end of the experiment 6 out of 13 animals reduced their number of turns by  $\geq 10\%$ . Animals were sacrificed after the last evaluation and the number of surviving grafted cells were determined by direct counting. (b) Relation between the percentage of change in turn number at 4 wpg relative to the number of turns before grafting (x-axis) and the number of estimated surviving cells at 4 wpg (y-axis) for chromosphere-grafted animals used for the behavioral experiments in (a). The graph quadrant corresponding to a reduction in turn number is highlighted in teal. Each dot represents data from a single animal. The obtained relation shows that all animals with a reduction in turn number have surviving grafted cells, and that, with two notable exceptions, animals without changes in turn number did not present any surviving grafted cells.

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g008

exhibit better properties as those of differentiated CC in the context of PD. To test this, we grafted 6-OHDA-lesioned animals with CC obtained from 3 days cultures and tested for their ability to reduce turning behavior after treatment with amphetamine, as done previously for chromosphere grafts. These results were compared with our data from amphetamine-induced circling behavior in chromosphere grafted animals and 6-OHDA lesioned animals evaluated during 12 wpg (Fig 4a). Eight out of 10 chromaffin-grafted animals showed a reduction in turn-number during the first two evaluations, with a mean of 40% decrement during the first evaluation (similar to chromosphere-grafted animals) and a 27% mean decrement during all the 3 months, which is lower than the reduction in chromosphere-grafted animals (Fig 9a and S4 Fig). The decrement in turn number was statistically different at 2 and 8 wpg when the turn numbers of animals grafted with CC were compared with lesioned animals without grafts, but not when compared with their circling behavior before grafting (Fig 9a). These results suggest that chromosphere grafts produce a more robust and consistent improvement in motor alterations as compared with CC grafts.

The lower motor improvement produced by CC grafts could be due to lower long-term survival of the grafts, deficient dopamine release and/or other dopamine-independent mechanisms. In order to determine whether CC survive less than chromosphere-derived cells, we quantified chromaffin graft-survival at 12 wpg using the animals from the behavioral experiment described above, and compared these results with our data for chromosphere grafts at 12 wpg (Fig 7d). Calculating the average number of surviving CC at 12 wpg only for the few animals with surviving cells, as we had previously done for chromospheres, suggests that chromosphere-grafted cells had a  $\sim 7.3$ -fold higher survival than chromaffin-grafted cells, with an



**Fig 9. Comparison between chromosphere grafts and CC grafts.** (a) Percentage of change in circling behavior induced by amphetamine in 6-OHDA lesioned animals with either chromosphere ( $n = 7$ , orange) or CC ( $n = 8$ , purple) grafts and in a 6-OHDA lesioned group ( $n = 6$ ). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. The dotted horizontal line denotes a reduction in turn number of 50%. Significant differences in chromaffin grafted animals were observed at 2 and 8 wpg when compared to the lesioned group without graft (repeated measures multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 6.991$ ,  $DF = 23$ ,  $p < 0.0001$ ; followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ) (black asterisks), but not when compared with their circling behavior before grafting (repeated measures ANOVA,  $F = 1.142$ ,  $r^2 = 0.1402$ ,  $p = 0.3485$ ). (b) The survival of chromaffin grafted cells was determined by directly counting TH<sup>+</sup> cells in immunostained coronal brain slices. The dots represent the number of surviving grafted cells from single animals, and the bars denote the mean  $\pm$  SEM. The dotted horizontal line represents the number of cells equivalent to  $1 \times 10^3$ . A significant difference was observed between chromaffin and chromosphere cell survival (Unpaired t-test,  $P > 0.05$ ,  $t = 3.572$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.0051^{**}$ ). (c) Percentage of dopaminergic cells in the lesioned SNpc in relation to the non-lesioned hemisphere in animals unilaterally lesioned with 6OHDA and grafted with either CC (grey) or chromospheres (black). The number of TH<sup>+</sup> cells in the SNpc of both the lesioned and non-lesioned sides was determined by direct cell counting of TH immunostained brain slices. Data was normalized to the number of counted TH<sup>+</sup> cells in the non-lesioned SNpc. Each data point represents an individual animal, and the mean  $\pm$  SEM is indicated by solid horizontal lines. The dotted horizontal line denotes a loss of 20% of TH<sup>+</sup> cells in the lesioned hemisphere compared to the non-lesioned SNpc. No significant differences were observed (two-tailed unpaired t-test) between animals grafted with either chromospheres or CC, suggesting that the degree of lesion induced by the 6-OHDA toxin was similar in all the analyzed animals.

doi:10.1371/journal.pone.0160854.g009

average number of  $634 \pm 34$  considering only the two animals with a surviving CC graft. However, one out of the 8 chromaffin-grafted animals was not included in the analysis as it exhibited an unusually large number of surviving grafted cells ( $\sim 30\,000$  TH<sup>+</sup> cells, larger than in all other grafted animals at 12 wpg and at other analyzed times). Notably, this animal presented a reduction in turning behavior of 47% at the end of the experiment (12 wpg). This reduction is only 1.7-fold better than the average value of the whole population of chromaffin grafted animals (27%), and not better than the mean of decrease observed in chromosphere-grafted animals (51%, Fig 9a). We also quantified the degree of dopaminergic denervation at the level of the SNpc in the 8 chromaffin-grafted animals used for the experiments described above, and we detected an almost complete lesion (lesioned SNpc had only 0–10% of the TH<sup>+</sup> cells present

in the non-lesioned side). A similar degree of lesion in the SNpc of the 6-OHDA-treated animals that were used in the chromosphere-graft experiments (Fig 9c) was found. These results indicate that the loss of dopaminergic neurons within the SNpc induced by 6-OHDA was comparable in all the experiments in this study.

In addition, even in a short-term analysis (4 wpg), we observed that only three out of 12 animals grafted with CC presented low graft survival ( $0.20$ ,  $1.7$  and  $1.9 \times 10^3$  TH<sup>+</sup> cells respectively, with an average number of  $1\ 267 \pm 536$ ), whereas the rest of the animals presented a negligible level of graft survival (data not shown).

## Discussion

In the present study we determined the capacity of chromospheres to survive and to induce motor improvements in 6-OHDA-lesioned animals. We showed that chromospheres survive in ~57% of grafted animals. Also, when chromosphere grafted cells survived, they induced statistically significant motor improvements in an array of behavioral tests. In addition, we also showed that compared to CC, chromosphere-cells survive for longer periods of time and in higher numbers. Chromosphere grafts also induced a more consistent motor improvement than CC based on our own results and on similar measurements of motor improvement by CC grafts reported by others [5,31,32]. In animals with surviving grafted cells, chromosphere survival was found to be 3.5- and 7-fold greater than CC in both short- (4 wpg) and medium-term (12 wpg), respectively. Notably, the survival of chromospheres detected in this study is slightly higher than the survival of CC measured in other studies where CC's were either transdifferentiated with neuronal growth factor (NGF) [33,34], grafted together with implanted pumps for NGF delivery [35], or co-grafted with NGF producing cells [33,36,37]. The former procedures produced only a 4-fold higher survival than untreated CC.

On the other hand, previous studies have shown that fetal mesencephalic cells and dopaminergic neurons derived from embryonic stem cells have a significantly better survival than CC after being grafted into PD animal models. In this regard, fetal mesencephalic cells have exhibited a survival of 3–5% out of the total grafted cells [8], which is higher than our 1.5% survival of chromosphere-cells at 12 wpg (equivalent to ~4 638 TH<sup>+</sup> cells). Dopaminergic neurons derived from stem cells, on the other hand, have exhibited a survival of 2.7% [38], 4.1% [39] or 6% [40], and have been evaluated in some cases for longer periods of time than the three months evaluated in this study. In addition, both fetal mesencephalic cells and dopaminergic cells derived from stem cells have shown to induce a good motor recovery with a minimal number of surviving cells: ~657 fetal mesencephalic cells achieved ~50% of reduction in apomorphine-induced turns in the 6-OHDA model [41], and ~986 dopaminergic neurons derived from human stem cells were reported to achieve a complete reduction in turns induced by amphetamine [42]. The reported functional potency of chromospheres was > 40% in amphetamine-induced rotations, with a minimal requirement of 3 498 TH<sup>+</sup> surviving cells (Fig 8), although we did observe in some animals that have > 4 300 surviving cells a reduction in turn number of almost 100%.

Although chromosphere survival and functionality was lower than what has been obtained using fetal mesencephalic cells and dopaminergic neurons from embryonic stem cells, it is important to note that when chromosphere grafts survive they actually produce significant motor improvements in the three behavioral tests used in this study. The properties of the chromospheres could be potentially improved through different culture manipulations. As an example, chromosphere cells can be transformed into a more neuron-like morphology in culture [22,43], which could potentially enable them to extend projections and to better integrate into the host circuit after grafting. This could be relevant as the lack of innervation of the host

striatum by the grafted chromospheres observed in the present work could be a contributing factor to their lower functional potency.

The difference observed between the survival of CC and chromospheres could be due to the latter deriving from the expansion and aggregation of progenitor-like cells, together with the changes induced by the chromosphere culture protocol [19–22]. Evidence supporting this idea has been obtained by different approximations. First, chromosphere cells possess the ability of self-renewal, as they form clonal-secondary spheres [20]. Second, the chromosphere culture protocol has been shown to increase the expression of neural stem cell markers such as Nestin, CD133, Notch-1, Notch-2, Hes-1, NGF receptor, Musashi-1, Snai-2, Sox-9, Sox-10 among others, detected at the mRNA level by using RT-PCR [19–22] and microarrays [44]. Notably, CC do not express these markers or express them at very low levels [20,21]. The mechanisms underlying these changes in expression are not clear, but the natural environment in which adrenal medulla cells are located contributes to their protein expression pattern [45]. Local factors released from the adrenal cortex (e.g. steroid hormones and growth factors) influence CC differentiation and proliferation [46,47]. Thus, the isolation of adrenal medulla cells together with the culture conditions employed for chromosphere formation could contribute to the enrichment and expansion of chromaffin progenitor-like cells and the increment in neuronal progenitor markers. bFGF, which was included in the culture medium used to induce formation of chromospheres, could be playing a determinant role. This mitogenic factor has been shown to increase the number of dopaminergic neurons derived from cultured fetal mesencephalic cells [48], and has been used in several protocols for the *in vitro* differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons, and to support the survival of the cells [49]. Addition of bFGF to CC cells in culture has been shown to induce a neuronal trans-differentiation and to promote the outgrowth of processes. However, the changes induced by bFGF are smaller than those produced by NGF [50]. Also important is that trans-differentiated CC appear to have difficulties to survive for more than 6 days in bFGF containing-medium [50], contrary to chromospheres that can be maintained by several weeks [20].

An additional and important issue that should be noted is that regardless of the medium-term survival observed in chromosphere grafts, there was a large population of animals (43% out of all grafted animals) in which the graft did not survive (Table 2, bottom panel). The absence of grafted cells in some of the animals could be related to the implantation procedure, as one out of 6 animals sacrificed 24 h after grafting did not exhibit any grafted-cells (Table 2, top panel). Nevertheless, it is likely that other factors could be involved. In this regard, the immune system could be playing an important role in the rapid and effective clearance of the graft observed during the first week, which was equivalent to a 95% decrement from the initial number of grafted cells. If this were true, improving the immunosuppression regimen could enhance the long-term survival of chromospheres and increase the number of animals in which the grafts survive at all. Accordingly, Jensen et al [51] reported that the oral administration of the immunosuppressant cyclosporine, used in the present study, is less effective for preventing graft rejection than its parenteral administration. However, our results also showed that survival of the grafted chromosphere cells is not the only factor involved in generating a functional recovery, as some animals presented no motor improvements despite having equivalent levels of graft survival as animals that presented robust motor improvements. Thus, in order to provide a predictable and positive outcome for any type of graft it is important to identify the sources of such experimental variability.

Finally, it must be mentioned that the mechanism by which grafted chromospheres are able to produce motor improvements is unclear. Speculatively, both pharmacological tests used in this study indirectly suggest that the grafts release dopamine, as both assays are directed towards uncovering imbalances in dopamine neurotransmission between the lesioned and the

intact hemispheres by specifically promoting dopamine release or by activating dopamine receptors. In the beam test it has also been shown that the administration of drugs that increase the dopaminergic transmission in the striatum of aged rats (e.g. levodopa and amphetamine) leads to improved performance [24], suggesting that the release of dopamine also plays an important role in the outcome of this non-pharmacological test. However, other substances released by the grafts could also contribute to the functional recovery. Among those substances, noradrenaline and adrenaline could also be playing an important role as they have been shown to activate dopaminergic receptors [52,53], and are released by chromospheres in much larger quantities than dopamine when assayed *in vitro* (Fig 3). It is important to note that as a consequence of dopaminergic-receptor hypersensitivity in the lesioned side [54–56], low quantities of dopamine released by the grafts could be sufficient to enhance behavioral responses associated with dopamine-function. In addition, it must be mentioned that chromospheres are composed of a heterogeneous population of cells and that other factors not related to catecholamines could contribute to the mechanism responsible for the functional improvement caused by the grafts. In early transplantation studies using adrenal and extra-adrenal derived CC, it was shown that the sprouting of surviving host dopaminergic fibers caused by neurotrophic factors (e.g. glial cell derived neurotrophic factor) released by the grafted cells was a major determinant for the functional effect of the grafts [8]. However, in the present study we did not observe TH immunoreactivity outside the grafted area (Fig 6), suggesting that chromosphere grafted cells are not inducing a neuroprotective action on the host dopaminergic fibers, at least under our experimental conditions. However, this observation does not rule out a role for other non-catecholamine molecules in producing the motor improvements caused by the grafts, and more studies are necessary in this regard.

This is the first study that determines the potential use of chromospheres as a cell replacement candidate in PD. Further experiments will be necessary to optimize the functional outcome and survival of this cell source. These include grafting cultured dopaminergic-like neurons derived from chromospheres [22], grafting cultured chromospheres derived from a more homogeneous cell population, grafting specific cell types derived from chromosphere (e.g. TH<sup>+</sup>/DBH<sup>+</sup> cells), or optimizing the immunosuppression regimen. Other important aspects that require further investigation are the mechanisms responsible for the motor improvement as a consequence of the grafts including the role of other substances (such as growth factors), the electrophysiological properties of the grafted cells and the relation between the release of dopamine and other substances with the motor improvement.

## Supporting Information

### S1 Fig. Individual data from circling behavior induced by amphetamine and apomorphine.

(a) Amphetamine- and (b) apomorphine- induced circling behavior was evaluated in three groups at different times: 6-OHDA lesioned (n = 6 for amphetamine and n = 6 for apomorphine, black), 6-OHDA+vehicle (n = 6 for amphetamine and n = 6 for apomorphine, blue) and 6-OHDA+chromosphere grafts (n = 7 for amphetamine and n = 6 for apomorphine, orange). For all 6-OHDA-treated animals, the number of turns after the lesion measured in the two evaluations previous to the start of the experiment (7 and 14 days after 6-OHDA administration) were used as reference for calculating the percentage of change in the number of turns in the evaluations after surgery (starting at 7 days after grafting). “Weeks post-surgery” denotes the time elapsed since chromospheres were surgically implanted in the test group. Each data point represents the percentage of change in turn number for a single animal after one evaluation, and the lines represent the mean of each group for each evaluation. The dotted line denotes no change (0%). (TIF)



**S2 Fig. Motor performance during the beam test at 2, 6 and 8 weeks post-grafting. (a-c, left)** The total time (seconds) that the animals took to complete the test and **(a-c, right)** the time during which the animals remained immobile (no-movement time) while the test was on-going were measured in four different experimental groups. The performance of each animal was evaluated in all beam widths (3, 6, 12, 18 and 24 mm). The following groups were included in the experiment: control (n = 8, gray), Sham (n = 8 blue), 6-OHDA (n = 7, black), 6-OHDA + chromosome grafts (n = 8, orange). Evaluations in all groups were carried out periodically for 3 months after the grafting surgery. Only the evaluations obtained after 2-weeks, 6-weeks and 8-weeks post-grafting are shown. Empty orange bars are the measurements from the grafted animal group obtained after the 6-OHDA-lesion procedure but before grafting. Significant differences were observed between the total time and no movement time measured before grafting and the total time and no movement time of the same group after grafting (orange asterisks) (repeated measures multivariate ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $F = 5.349$ ,  $DF = 4$ ,  $p = 0.0018$ ; followed by Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Also, significant was the difference in some evaluations in both the total and no movement time between 6-OHDA lesioned animals without graft and 6-OHDA lesioned animals with chromospheres, control and sham groups (black asterisks) (repeated measures multivariate ANOVA,  $P < 0.05$ ,  $F = 36.17$ ,  $DF = 7$ ,  $< 0.0001$ ; followed by Bonferroni's multiple comparisons *post hoc* test,  $p < 0.05^{*}$ ,  $p < 0.01^{**}$  and  $p < 0.001^{***}$ ). Error bars are the SEM. (TIF)

**S3 Fig. Survival of chromospheres grafted into the striatum of 6-OHDA lesioned rats at 24 h post-grafting.** The TH<sup>+</sup> surviving-grafted cells were counted manually from images obtained with a 40x objective (at 1, 2, 4 and 12 wpg) or estimated from the total TH<sup>+</sup> immunostained area from 10x reconstructions (24 h post-grafting). No statistical analysis was performed to compare survival after 24h with 1–12 wpg, since we used different quantification methods, but an almost 3-fold higher number of TH<sup>+</sup> cells at 24 h post-grafting compared to 1 wpg can be observed. (TIF)

**S4 Fig. Individual data of amphetamine circling behavior of chromosome and CC grafted animals.** Circling behavior induced by amphetamine was evaluated in 6-OHDA lesioned animals with chromaffin (n = 8, purple) and chromosome (n = 7, orange) grafts at 12 wpg. The percentage of change in turn number was calculated relative to the number of turns before grafting for each individual animal. Each data point represents the percentage of change in turn number for a single animal after one evaluation, and the lines represent the mean of each group for each evaluation. The dotted line denotes no change (0%). (TIF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Jose Segovia-Vila (CINVESTAV) and Dr. Arturo Hernández-Cruz (IFC, UNAM) for critical comments and helpful discussions. We also thank Dr. Monika Ehrhart-Bornstein (who unfortunately passed away in recent months) and Dr. Vladimir Vukicevic (University Clinic Dresden, University of Technology) for teaching us the chromosome-cell culture protocol. We are also grateful to Paulina Montoya and Alejandra Gómez for their assistance in some experiments, and to Luis Eduardo de Jesús Rosales Zariñana and María Norma Zariñana Camacho who provided us the bovine adrenal glands. We thank Ana María Escalante and Francisco Pérez-Eugenio for computer/technical assistance.

ABG received a PhD fellowship from CONACyT-México. This work is part of the fulfillment of requirements for ABG's PhD degree in Biomedical Science from the Universidad

Nacional Autónoma de México. We thank the Posgrado en Ciencias Biomédicas and the Universidad Nacional Autónoma de México.

## Author Contributions

**Conceived and designed the experiments:** ABG MGC RDC.

**Performed the experiments:** ABG MPR DMA.

**Analyzed the data:** ABG.

**Contributed reagents/materials/analysis tools:** MGC RDC.

**Wrote the paper:** ABG MGC RDC.

## References

1. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004; 318: 121–34. PMID: [15338272](#)
2. García-Montes J, Boronat-García A, Drucker-colín R. Pharmacological strategies for Parkinson's disease. *Health*. 2012; 4: 1153–1166.
3. Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Bonucelli U, et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord*. 2004; 19: 997–1005. PMID: [15372588](#)
4. Lindvall O, Björklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2004; 1: 382–93. PMID: [15717042](#)
5. Freed WJ, Morihisa JM, Spoor E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, et al. Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature*. 1981; 292: 351–2. PMID: [7254334](#)
6. Morihisa JM, Nakamura RK, Freed WJ, Mishkin M, Wyatt RJ. Adrenal medulla grafts survive and exhibit catecholamine-specific fluorescence in the primate brain. *Exp Neurol*. 1984; 84: 643–53. PMID: [6723885](#)
7. Fiandaca MS, Kordower JH, Hansen JT, Jiao SS, Gash DM. Adrenal medullary autografts into the basal ganglia of Cebus monkeys: Injury-induced regeneration. *Exp Neurol*. 1988; 102: 76–91. PMID: [2903068](#)
8. Fernandez-Espejo E, Armengol J, Flores J, Galan-Rodríguez B, Ramiro S. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 49: 343–54. PMID: [16111561](#)
9. Madrazo I, Drucker-Colín R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 1987; 316: 831–4. PMID: [3821826](#)
10. Barker RA, Drouin-Ouellet J, Parmar M. Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11: 492–503. doi: [10.1038/nrneurol.2015.123](#) PMID: [26240036](#)
11. Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*. 1979; 204: 643–647. PMID: [571147](#)
12. Björklund A, Stenevi U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res*. 1979; 177: 555–560. PMID: [574053](#)
13. Brown V, Dunnett SB. Comparison of adrenal and foetal nigral grafts on drug-induced rotation in rats with 6-OHDA lesions. *Exp Brain Res*. 1989; 78: 343–368.
14. Bjorklund A, Kordower JH. Cell therapy for Parkinson's disease: what next? *Mov Disord*. 2013; 28: 110–5. doi: [10.1002/mds.25343](#) PMID: [23390097](#)
15. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 268–77. doi: [10.1038/nrc3034](#) PMID: [21390058](#)
16. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007; 448: 313–7. PMID: [17554338](#)
17. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med*. 2006; 12: 1259–68. PMID: [17057709](#)

18. Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease-give up or move forward? *Mov Disord.* 2013; 28: 268–273. doi: [10.1002/mds.25378](https://doi.org/10.1002/mds.25378) PMID: [23401015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401015/)
19. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, Stadel D, Braubach P, Debatin K-M, et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS One.* 2013; 8: e64454. doi: [10.1371/journal.pone.0064454](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064454) PMID: [23675538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23675538/)
20. Chung K-F, Sicard F, Vukicevic V, Hermann A, Storch A, Huttner WB, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells.* 2009; 27: 2602–13. doi: [10.1002/stem.180](https://doi.org/10.1002/stem.180) PMID: [19609938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19609938/)
21. Santana MM, Chung K-F, Vukicevic V, Rosmaninho-Salgado J, Kanczkowski W, Cortez V, et al. Isolation, characterization, and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1: 783–91. doi: [10.5966/sctm.2012-0022](https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0022) PMID: [23197690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23197690/)
22. Vukicevic V, Schmid J, Hermann A, Lange S, Gebauer L, Chung K, et al. Differentiation of Chromaffin Progenitor Cells to Dopaminergic Neurons. *Cell Transplant.* 2012; 21: 2471–2486. doi: [10.3727/096368912X638874](https://doi.org/10.3727/096368912X638874) PMID: [22507143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22507143/)
23. García-Montes J-R, Boronat-García A, López-Colomé A-M, Vargas J, Guerra-Crespo M, Drucker-Colín R. Is nicotine protective against Parkinson's disease? An experimental analysis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012; 11: 897–906. PMID: [23131151](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23131151/)
24. Drucker-Colín R, García-Hernández F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J Neurosci Methods.* 1991; 39: 153–161. PMID: [1798345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1798345/)
25. Rasband W. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
26. Galan-Rodriguez B, del-Marco A, Flores J, Ramiro-Fuentes S, Gonzalez-Aparicio R, Tunez I, et al. Grafts of extra-adrenal chromaffin cells as aggregates show better survival rate and regenerative effects on parkinsonian rats than dispersed cell grafts. *Neurobiol Dis.* 2008; 29: 529–42. doi: [10.1016/j.nbd.2007.11.009](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.11.009) PMID: [18206378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18206378/)
27. Björklund L, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IYC, McNaught KSP, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 2344–2349. PMID: [11782534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782534/)
28. Grealish S, Jönsson ME, Li M, Kirik D, Björklund A, Thompson LH. The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Brain.* 2010; 133: 482–95. doi: [10.1093/brain/awp328](https://doi.org/10.1093/brain/awp328) PMID: [20123725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123725/)
29. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 1946; 94: 239–47. PMID: [21015608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21015608/)
30. Voutilainen MH, Bäck S, Pörsti E, Toppinen L, Lindgren L, Lindholm P, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2009; 29: 9651–9. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0833-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0833-09.2009) PMID: [19641128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19641128/)
31. Fernandez-Espejo E, Gonzalez-Albo MC, Moraes J, El Banoua F, Flores JA, Caraballo I. Functional Regeneration in a Rat Parkinson's Model after Intrastratial Grafts of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Transforming Growth Factor b1 -Expressing Extra-Adrenal Chromaffin Cells of the Zuckerkandl's Organ. *J Neurosci.* 2001; 21: 9888–9895. PMID: [11739596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11739596/)
32. Date I, Shingo T, Ohmoto T, Emerich DF. Long-Term Enhanced Chromaffin Cell Survival and Behavioral Recovery in Hemiparkinsonian Rats with Co-grafted Polymer-Encapsulated Human NGF-Secreting Cells. *Exp Neurol.* 1997; 17: 10–17.
33. Cunningham LA, Hansen JT, Priscilla Short M, Churchill Bohn M. The use of genetically altered astrocytes to provide nerve growth factor to adrenal chromaffin cells grafted into the striatum. *Brain Res.* 1991; 561: 192–202. PMID: [1686984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1686984/)
34. Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruiz J, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A, et al. Comparison between low frequency magnetic field stimulation and nerve growth factor treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties, and grafting in nigrostriatal lesioned rats. *Mol Cell Neurosci.* 1994; 5: 485–98. PMID: [7704421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7704421/)
35. Strömberg I, Herrera-Marschitz M, Ungerstedt U, Ebendal T, Olson L. Chronic implants of chromaffin tissue into the dopamine-denervated striatum. Effects of NGF on survival, fiber growth and rotational behavior. *Exp Brain Res.* 1985; 60: 335–349. PMID: [4054276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4054276/)
36. Bing G, Notter MFD, Hansen JT, Kellogg C, Kordower JH, Gash DM. Cografts of adrenal medulla with C6 glioma cells in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions. *Neuroscience.* 1990; 34: 687–697. PMID: [1972269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1972269/)
37. Nijijima K, Chalmers GR, Peterson DA, Fisher LJ, Patterson PH, Gage FH. Enhanced survival and neuronal differentiation of adrenal chromaffin cells cografed into the striatum with NGF-producing fibroblasts. *J Neurosci.* 1995; 15: 1180–94. PMID: [7869093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7869093/)

38. Cho MS, Lee Y-E, Kim JY, Chung S, Cho YH, Kim D-S, et al. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 3392–7. doi: [10.1073/pnas.0712359105](https://doi.org/10.1073/pnas.0712359105) PMID: [18305158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18305158/)
39. Kim J-H, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson ' s disease. *Nature*. 2002; 418: 50–6. PMID: [12077607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12077607/)
40. Kriks S, Shim J-W, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. Nature Publishing Group; 2011; 480: 547–51.
41. Rath A, Klein A, Papazoglou A, Pruszek J, Garciaa J, Krause M, et al. Survival and Functional Restoration of Human Fetal Ventral Mesencephalon Following Transplantation in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant*. 2012; 22: 1281–1293. doi: [10.3727/096368912X654984](https://doi.org/10.3727/096368912X654984) PMID: [22963760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22963760/)
42. Grealish S, Diguët E, Kirkeby A, Mattsson B, Heuer A, Bramouille Y, et al. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*. 2014; 15: 653–665. doi: [10.1016/j.stem.2014.09.017](https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017) PMID: [25517469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25517469/)
43. Vukicevic V, de Celis MFR, Diaz-valencia G, Bornstein SR, Ehrhart-bornstein M. Modulation of Dopaminergic Neuronal Differentiation from Sympathoadrenal Progenitors. *J Mol Neurosci*. 2012; 48: 420–6. PMID: [22447400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22447400/)
44. Vukicevic V, de Celis MFR, Pellegata NS, Bornstein SR, Androutsellis-Theotokis A, Ehrhart-Bornstein M. Adrenomedullary progenitor cells: Isolation and characterization of a multi-potent progenitor cell population. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 408: 178–84. doi: [10.1016/j.mce.2014.12.020](https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.020) PMID: [25575455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25575455/)
45. Ehrhart-Bornstein M, Vukicevic V, Chung K-F, Ahmad M, Bornstein SR. Chromaffin progenitor cells from the adrenal medulla. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30: 1417–23. doi: [10.1007/s10571-010-9571-3](https://doi.org/10.1007/s10571-010-9571-3) PMID: [21080061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21080061/)
46. Huber K, Kalcheim C, Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci*. Elsevier B.V.; 2009; 151: 10–6.
47. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1148: 112–7. doi: [10.1196/annals.1410.053](https://doi.org/10.1196/annals.1410.053) PMID: [19120098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120098/)
48. Bouvier MM, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci*. 1995; 15: 7141–9. PMID: [7472468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7472468/)
49. Correia AS, Anisimov SV, Li J-Y, Brundin P. Growth factors and feeder cells promote differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons: a novel role for fibroblast growth factor-20. *Front Neurosci*. 2008; 2: 26–34. doi: [10.3389/neuro.01.011.2008](https://doi.org/10.3389/neuro.01.011.2008) PMID: [18982104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18982104/)
50. Stemple DL, Mahanthappa NK, Anderson DJ. Basic FGF induces neuronal differentiation, cell division, and NGF dependence in chromaffin cells: A sequence of events in sympathetic development. *Neuron*. 1988; 1: 517–525. PMID: [3272178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3272178/)
51. Jensen MB, Krishnaney-Davison R, Cohen LK, Zhang S-C. Injected Versus Oral Cyclosporine for Human Neural Progenitor Grafting in Rats. *J Stem Cell Res Ther*. 2012; Suppl 10: 003.
52. Lanau F, Zenner MT, Civelli O, Hartman DS. Epinephrine and norepinephrine act as potent agonists at the recombinant human dopamine D4 receptor. *J Neurochem*. 1997; 68: 804–12. PMID: [9003072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9003072/)
53. Root DH, Hoffman AF, Good CH, Zhang S, Gigante E, Lupica CR, et al. Norepinephrine activates dopamine D4 receptors in the rat lateral habenula. *J Neurosci*. 2015; 35: 3460–9. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4525-13.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4525-13.2015) PMID: [25716845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25716845/)
54. Kim DS, Szczypka MS, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. *J Neurosci*. 2000; 20: 4405–13. PMID: [10844009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10844009/)
55. Creese I, Burt D, Snyder S. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*. 1977; 197: 596–598. PMID: [877576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/877576/)
56. Kelly PH, Seviour PW, Iversen SD. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res*. 1975; 94: 507–22. PMID: [1171714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1171714/)