



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Expresión de marcadores neuronales y dopaminérgicos a  
corto plazo por el implante de células progenitoras  
entéricas en la SNpc en el modelo neurotóxico de 6-OHDA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**JESÚS EDUARDO OROZCO CASTILLO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en F.C. MARÍA DEL CARMEN PARRA CID  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo se realizó en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y  
Medicina Regenerativa del  
Instituto Nacional de Rehabilitación – Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

La toma de imágenes por inmunofluorescencia se realizó en el laboratorio de  
Biotecnología del CENIAQ



Este trabajo fue apoyado por el proyecto INR-19/14 y aprobado por el CICUAL

## **Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde la Escuela Nacional Preparatoria N° 1 “Gabino Barreda” me ha permitido desarrollarme de forma académica, en la cual desarrolle el gusto por la investigación, la ciencia, que, en la Facultad de Ciencias, se transformaron en amor, en mi principal pasión.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” por brindarme todas las oportunidades y facilidades para la realización de este trabajo de tesis.

A la M. en F.C. María del Carmen Parra Cid por aceptarme como su alumno todo este tiempo, desde hacer mi último nivel de taller, pasando por mi servicio social, hasta ser mi asesora de tesis. Sin usted nada de esto sería posible.

A Xochitl Guerrero por toda la ayuda brindada este tiempo en el laboratorio, por siempre proporcionar el material.

A Julieta García por enseñarme todas las técnicas realizadas en este trabajo, además de todos los comentarios realizados para este trabajo.

A la Dra. Elena Contreras por su gran ayuda con los animales, además de siempre ayudarme cuando hizo falta.

A la Dra Alette Ortega Gómez gracias por todos los críticas constructivas realizadas para enriquecer el trabajo, además del interés en el desarrollo del mismo.

Al Dr. Rigoberto Gonzales Piña por su tiempo invertido en las correcciones del trabajo y sus comentarios para el enriquecimiento del trabajo.

Al Dr. Alonso Martínez Canabal gracias por las clases durante la carrera, también por los comentarios hechos a favor de mejorar el trabajo escrito

Dra. María de Lourdes Segura Valdez por sus aportaciones al trabajo y el tiempo dedicado.

## **Dedicatorias.**

A mi madre, María del Socorro Castillo Chávez, siempre fuiste la primera en creer en mí, en estar todo el tiempo a mi lado, quien me enseñó desde leer, hasta buscar artículos científicos. Gracias por ser mi madre, mi amiga, y un gran ejemplo a seguir, por enseñarme que nunca hay que rendirnos, luchar hasta el final. No son suficientes las palabras para expresarte lo mucho que te amo, y lo mucho que siempre te amaré.

A mi papá, Jesús Imeldo Orozco Pérez, gracias por estar en los momentos más difíciles junto a mí, por ser mi amigo, por brindarme la confianza.

A mi hermosa Aliné, trajiste la mayor alegría a mi vida, con tu sonrisa, por alegrarme todos los días.

A mi hermana Paola Orozco Castillo, gracias por ser mi amiga todo este tiempo, por aceptarme en tu oficina en las noches después de que tomaba clases en el INNN, por invitarme a comer cuando llegaba antes.

A mi hermano Carlos Orozco Castillo, por ayudarme desde el primer día a la preparatoria, a la facultad, por estar a mi lado todo el tiempo, siempre estando al pendiente de cuando llegaba de las prácticas de campo.

Itzel I., gracias por ser mi amiga por más de 8 años seguidos, por estar a mi lado con un buen consejo hasta hacerme reír. A Mayra Q. por estar a mi lado en los momentos más difíciles. A Ilse Q. por todas esas veces que fuiste un gran aliento para seguir adelante, por irnos a comer siempre que podíamos, a Alejandra M. por siempre hacerme reír y estar juntos. Gracias a todas por ser las mejores amigas, tal vez no sea el más expresivo, pero quiero que sepan que son muy importantes para mí.

A Karla Z., gracias por siempre estudiar juntos, pasar los mejores momentos en la facultad, hacer prácticas del laboratorio y pasar las mejores clases. A Axell L., fuiste mi primer apoyo en el momento más difícil de mi vida, se que siempre puedo contar contigo. Carolina C. amigos desde la secundaria, sabíamos que íbamos a llegar muy lejos, y que mejor que volver a encontrarnos tiempo después en el INR.

A Hipólito R. y Ana Cristina D. gracias por hacer el mejor año en el INR, todos los desayunos, el hacer mi trabajo más divertido, siempre más interesante.

Tal vez hay personas que no mencione, pero estoy de ponerse expresivo no es lo mío, gracias a todos los que me ayudaron a que este sueño se vuelva realidad.

## INDICE

	Pag.
1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
3.1 Enfermedad de Parkinson	3
3.2 Causas de la Enfermedad de Parkinson	3
3.2.1 Estrés oxidativo	3
3.2.2 Disfunción mitocondrial.	4
3.3 Dopamina	5
3.4 Deficiencias en el tratamiento con L-DOPA:	7
3.5 Ganglios Basales	8
3.6 Modelo neurotóxico de 6-OHDA	10
3.6.1 Quinonas	11
3.6.2 Estrés oxidativo causado por 6-OHDA	11
3.6.3 Defectos mitocondriales causados por 6-OHDA	11
4. Antecedentes	12
4.1 Características de las células progenitoras adultas: Fuentes de obtención de células dopaminérgicas	12
4.2 Terapia de reemplazo celular	12
4.3 El SNE como fuente de obtención de células troncales y progenitoras	14
4.4 Neurogénesis en el cerebro adulto	14
4.5 Plasticidad	16
4.6 La dopamina como elemento regulador de la neurogénesis	17
4.7 Dopamina en el SNE	17
5. Justificación	18
6. Pregunta de investigación	19
7. Hipótesis	20
8. Objetivo general	21
8.1 Objetivos particulares	21
9. Metodología	22
9.1 Animales de Experimentación	22

9.2 Tratamiento previo al análisis histológico	22
9.3 Grupos experimentales	22
9.4 Obtención de muestra	22
9.5 Inclusión de muestra en parafina y cortes histológicos	23
9.6 Histología	24
9.6.1 Tinción de Nissl	24
9.6.2 Inmunohistoquímica para Tirosina-Hidroxilasa	25
9.6.3 Inmunofluorescencia para MAP-2	25
10. Análisis de Resultados	26
11. Análisis estadístico	26
12. Resultados	28
12.1 Análisis morfológico del Estriado y SNpc	28
12.2 Análisis de la expresión de Tirosina-Hidroxilasa	30
12.3 Análisis en la expresión de MAP-2 en SNpc	32
13. Discusión	33
14. Conclusión	34
15. Perspectivas	34
16. Bibliografía	35
17. Congresos	41
18. Anexos	49

## 1. Abreviaturas.

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
$\alpha$ -sin	$\alpha$ -sinucleína
ATV	Área tegmental ventral
BO	Bulbo olfatorio
CN	Cresta Neural
COMT	Catecol metil transferasa
CPSNE	Células progenitoras del sistema nervioso entérico
DA	Dopamina
DAB	Diaminobencidina
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifeni-lacético
DPI	Días post implante
EP	Enfermedad de Parkinson
EROs	Especies reactivas de Oxígeno
ETOH	Etanol
GB	Ganglios basales
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína acida fibrilar de glía
GPe	Globo pálido externo
GR	Glía radial
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
L-Dopa	Levodopa
MAP-2	Proteína asociada a microtubulos 2
MAO-B	Monoamino oxidasa tipo B
NST	Núcleo subtalámico
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino con tritón
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNpr	Sustancia nigra <i>pars reticulata</i>
TH	Tirosina hidroxilasa
VRM	Vía rostral migratoria
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

## **2. Resumen.**

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo progresivo, que se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y una disminución de los niveles de dopamina en el estriado, que da como resultado acinesias, bradicinesias, discinesias y rigidez muscular. En la actualidad, los principales tratamientos para la EP, tienen como objetivo principal disminuir los síntomas motores, tal es el caso del tratamiento con L-DOPA en combinación con Carbidopa, con una dosis de 250/25mg de media o un comprimido por día, en el inicio del tratamiento, sin embargo, a largo plazo, se requiere de una dosis más alta de aproximadamente 8 comprimidos al día, también se incrementan los síntomas motores y se genera 6-OHDA de forma endógena. Debido a esto, surge la necesidad de proponer nuevas alternativas de tratamiento mediante técnicas de medicina regenerativa y terapia de reemplazo celular para reparar el tejido dañado. Es importante tener una adecuada fuente de obtención de células con características de troncalidad que ayuden a restaurar el tejido dañado. Una posible fuente de obtención de células progenitoras, es el Sistema Nervioso Entérico (SNE), ya que dicho sistema proviene de la cresta neural al igual que el Sistema Nervioso Central (SNC) durante el desarrollo embrionario expresando los mismos factores neurotróficos, factores de transcripción y neurotransmisores, y se ha demostrado que las Células Progenitoras de Sistema Nervioso Entérico (CPSNE) pueden diferenciarse hacia un linaje neural y glial. Este trabajo tiene como objetivo determinar si las CPSNE implantadas en la SNpc son capaces de mantenerse, proliferar y diferenciarse en el modelo neurotóxico de 6-OHDA. Los resultados nos indican que a corto plazo post implante no hay un cambio morfológico en la vía nigroestriatal, sin embargo, hay cambios en la expresión de TH y MAP-2. A los 5 y 10 días post implante, estos resultados estarían indicando que las CPSNE se están manteniendo y diferenciando hacia un linaje neuronal y dopaminérgico. Nuestros resultados sugirieron que el SNE sería una posible fuente de obtención de células progenitoras que mantienen su potencial de diferenciación hacia un linaje dopaminérgico, siendo una posible alternativa para restaurar tejido dañado en enfermedades neurodegenerativas como lo es la Enfermedad de Parkinson

### **3. Introducción.**

#### **3.1. Enfermedad de Parkinson.**

La EP es un desorden neurodegenerativo lento y progresivo, que se caracteriza por la pérdida de células dopaminérgicas en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc) (70%-90%) y una disminución de los niveles de Dopamina (DA) en el Estriado (Hernandez-Montiel, H. 2006).

La EP ocupa el segundo lugar como el desorden neurodegenerativo crónico más común, detrás del Alzheimer. Esta enfermedad aumenta el porcentaje de incidencia respecto a la edad. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que el 8.1% de la población en México es mayor a 60 años de edad, lo que implicaría una prevalencia aproximada de 83,000 y 166,600 personas con EP en México (Rodríguez-Violante, M. *et al.* 2011), mientras que la prevalencia de la EP se encuentra entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años de edad.

La EP está caracterizada por presentar síntomas motores como la discinesia, que es la presencia de movimientos involuntarios, la bradicinesia, caracterizada por dificultad para iniciar los movimientos y la rigidez en el tono muscular y temblor (Chávez-León, E. *et al.* 2013). Otra característica de la EP es la presencia de los cuerpos de Lewy, que son inclusiones o agregados de la proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) presentes en las neuronas dopaminérgicas (NDA) sobrevivientes en los pacientes con la EP (Hu, Q. *et al.* 2016).

#### **3.2. Causas de la Enfermedad de Parkinson.**

Son multifactoriales lo que implica que diversos y variados factores ejercen un efecto fisiopatológico que contribuye al desarrollo de esta enfermedad (Hernandez-Montiel, H. 2006), a continuación, se describen los dos más importantes.

##### **3.2.1. Estrés oxidativo.**

Se define como una alteración en el equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes (Betteridge, D. 2000). La oxidación de la DA se realiza, en un paso por la enzima monoamino oxidasa (MAO) hasta llegar a Ácido 3,4-dihidroxifenil-lacético (DOPAC), MAO es generadora de EROs, por consiguiente, las neuronas dopaminérgicas son susceptibles. Las neuronas dopaminérgicas contienen Hierro (Fe), el cual es catalizado por la reacción de Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^\bullet + Fe^{3+}$ ) (Blum, D. *et al.* 2001), generando así la oxidación de la DA y la formación de metabolitos reactivos como la *p*-quinona figura 1 la abundante DA citosólica se oxida fácilmente de forma espontánea para producir DA quinona. La neuromelanina, que es el resultado de auto oxidación, condensación y polimerización de la DA y de sus productos de oxidaciones, es acumulada en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc), en donde se une a diversas

especies reactivas, sin embargo, en condiciones de un ataque oxidativo, una baja en los niveles de glutatión libera dichas especies (Dorado-Martínez, C. *et al.* 2003; Hwang, O. 2013).

### **3.2.2. Disfunción mitocondrial.**

Se caracteriza por la falla en la actividad enzimática del complejo mitocondrial I, generación de EROs provocando una peroxidación de la cardiolipina (lípidos específicos de la mitocondria) lo que da como resultado la liberación de citocromo C, para desencadenar la apoptosis (Hwang, O. 2013), además, provoca un aumento en la transición de la permeabilidad mitocondrial, la pérdida de potencial de membrana y se incrementa la actividad de óxido nítrico sintasa (Bose, A. *et al.* 2016). Como evidencia en torno al daño mitocondrial, en relación al estrés oxidativo y al daño de células dopaminérgicas, surge del descubrimiento de las mutaciones en genes de proteínas mitocondriales como parkina y PINK, las cuales están ligadas a la EP (Moon, H. *et al.* 2015).

La proteína parkina, codifica a E3, que es una ubiquitina ligasa; la disminución en los niveles de parkina repercute de manera directa en la reducción de la actividad del complejo mitocondrial I y IV (Bose, A. *et al.* 2016). La principal teoría respecto a la parkina, es que, al perder su función, resulta en la acumulación de sustratos tóxicos para las células dopaminérgicas (Hu, Q. *et al.* 2016).

Entre las principales mutaciones genéticas en la EP es en el gen SNCA, el cual codifica para  $\alpha$ -sin. La  $\alpha$ -sin es comúnmente encontrada en los cuerpos de Lewy, siendo un estándar de oro para la detección de la EP por medio de inmunohistoquímica. Las tres características que permiten aseverar lo anterior son: la abundante presencia de  $\alpha$ -sin en el proceso neurítico, no sólo en el soma celular, ampliamente distribuida en diferentes regiones del cerebro y a diferencia de otras enfermedades denominadas sinucleinopatías, entre las que se encuentran la demencia con cuerpo de Lewy, enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Bradbury Egleston, la presencia de la  $\alpha$ -sin es diferente en cada una a nivel celular y se encuentran en diferentes regiones del cerebro en cada enfermedad (Stefanis L. 2012).

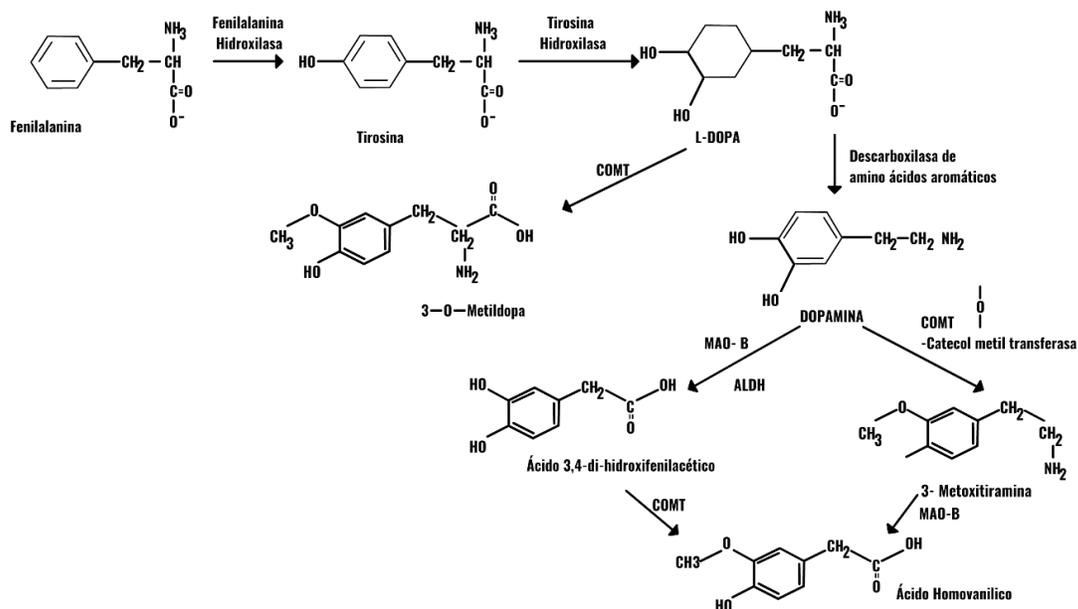
Entre las funciones de la  $\alpha$ -sin es interaccionar con las vesículas sinápticas, la regulación del tráfico y endocitosis vesicular. La  $\alpha$ -sin se encuentra en la mitocondria, siendo principalmente soluble en el citoplasma, también ha sido localizada asociada a la membrana de las mitocondrias las cuales conectan a las mitocondrias al retículo endoplasmático. Un aumento en la expresión de la forma patogénica de  $\alpha$ -sin provoca una fragmentación mitocondrial, además de inhibir el complejo mitocondrial I (Hu, Q. *et al.* 2016).

### 3.3. Dopamina.

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante en el SNC en mamíferos, regula funciones como la motilidad gastrointestinal, ingesta de alimento, agua y la actividad locomotora.

El sistema dopaminérgico ha sido clasificado en ultracorto, de longitud intermedia y largo, los grupos neuronales que los conforman han sido nombrados A8 hasta A17. Los de interés para nuestro estudio son los largos, ya que en estos se encuentra involucrada la región retro bural (A8), el área tegmental ventral (A10) y la SNpc (A9), cuyas proyecciones llegan al caudado putamen; corteza límbica, al tubérculo olfatorio, núcleo accumbens y corteza piriforme (Bahena-Trujillo R, *et al.* 2000).

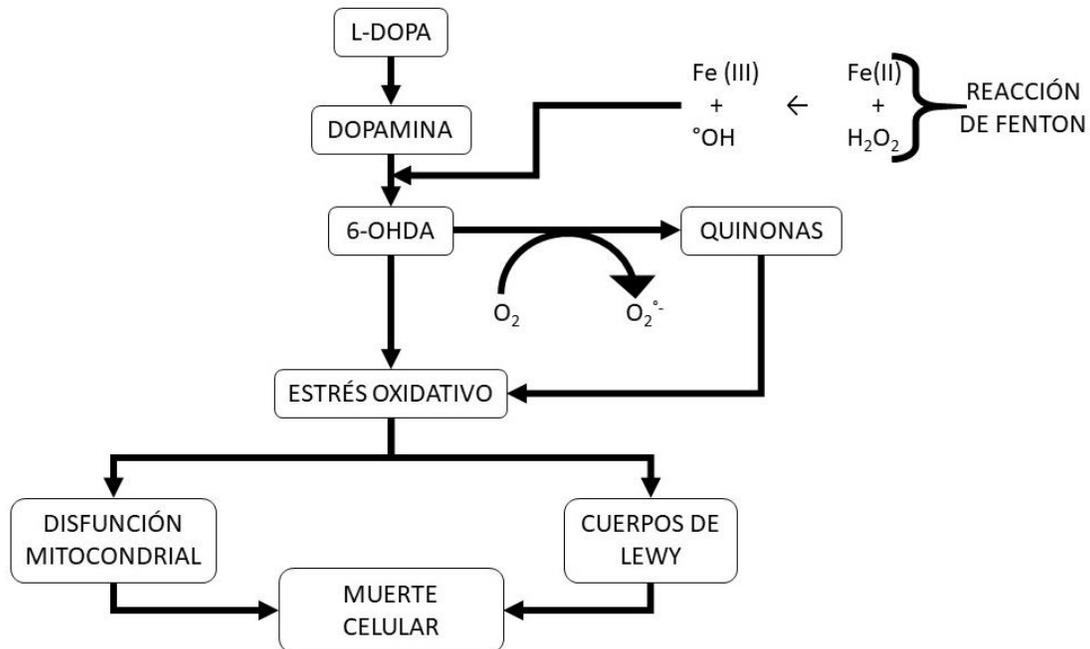
La síntesis de la DA comienza con síntesis de tirosina, por medio de la hidroxilación del aminoácido fenilalanina, posteriormente, se lleva a cabo la hidroxilación del aminoácido L-tirosina, el cual se considera como punto de regulación en el proceso de síntesis de las catecolaminas, que son compuestos formados por un anillo de benceno con dos hidroxilos (grupo catecol) y una cadena de etilamina, por tal motivo la Tirosina Hidroxilasa es la enzima limitante en la síntesis de la DA, como se muestra en la figura 3. El paso final, es la descarboxilación de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DAA) (Daubner, S. *et al.* 2011). El metabolismo de la DA incluye a enzimas como monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-o-metiltransferasa (COMT), cuyos productos finales son DOPAC y Ácido homovanílico (López S. *et al.* 2008).



**Figura 1. Síntesis y metabolismo de la Dopamina.** La dopamina se sintetiza a partir del amino ácido L-Tirosina, que es sintetizado por la fenilalanina hidroxilasa a partir de fenilalanina. La tirosina es sintetizada por la Tirosina hidroxilasa como enzima restrictiva de la vía de síntesis. La dopamina puede ser metabolizada por la enzima catecol-o-metiltransferasa (COMT), Monoamino oxidasa tipo B (MAO-B) (Tomado y modificado de LeWitt P. 2008).

### 3.4. Deficiencias en el tratamiento con L-DOPA.

Actualmente los tratamientos farmacológicos para la EP, tienen como objetivo disminuir los síntomas motores mediante el aumento de síntesis de DA. El principal tratamiento se realiza con el precursor dopaminérgico L-DOPA, que tiene efectos colaterales, entre estos, incremento de la generación de EROs, además de presentar una tendencia a la auto oxidación y formar 6-OHDA endógena (Borah, A. *et al.* 2012; Ramírez-García, G. 2015).



**Figura 2. Efectos secundarios de L-DOPA.** La L-DOPA produce 6-OHDA de forma endógena, posterior a la ingesta de L-DOPA, forma dopamina al ser sintetizada por la descarboxilasa de amino ácidos aromáticos, la dopamina por medio de la auto oxidación da lugar a la 6-OHDA endógena en presencia del radical (°OH). En presencia del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), la 6-OHDA se oxida para formar 6-OHDA-quinona. Esto lleva a un estrés oxidativo, que da como resultado una disfunción mitocondrial y a la formación de cuerpos de Lewy (Tomado y modificado de Borah A. *et al.* 2012)

### 3.5. Ganglios basales.

Los ganglios basales (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales interconectados que se encuentran ubicadas en la base del cerebro (Graybiel, A. 2000). Su principal función es conectar la corteza cerebral con los sistemas neurales encargados de ejecutar la conducta motora (Ávila-Luna, A. *et al.* 2014).

Los GB están clasificados en núcleos de entrada, núcleos intermedios y núcleos de salida. Las estructuras que conforman al núcleo de entrada se encargan de recibir la información que llega de diferentes lugares. Están compuestos por estriado y núcleo accumbens/caudado-putamen en primates. Este núcleo cuenta con aferencias excitatorias glutamatérgicas que provienen de la corteza cerebral y el tálamo, además es regulado por las vías dopaminérgicas mesencefálicas que se encuentran en la SN y el área tegmental ventral (ATV). Los núcleos intermedios están ubicados entre los núcleos de entrada y salida, están conformados por el globo pálido externo (GPe), núcleo subtalámico (NST) y la Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc). Las estructuras que se encargan de enviar información de los GB hacia el Tálamo forman el núcleo de salida, conformados por el globo pálido interno (GPi) y la Sustancia Nigra *pars reticulata* (SNpr) (Lanciego, J. *et al.* 2012).

Las proyecciones neurológicas son GABAérgicas que tienen un efecto inhibitorio en las estructuras que inervan, se observa en la figura 2 (Gómez-Chavarín, M. *et al.* 2014).

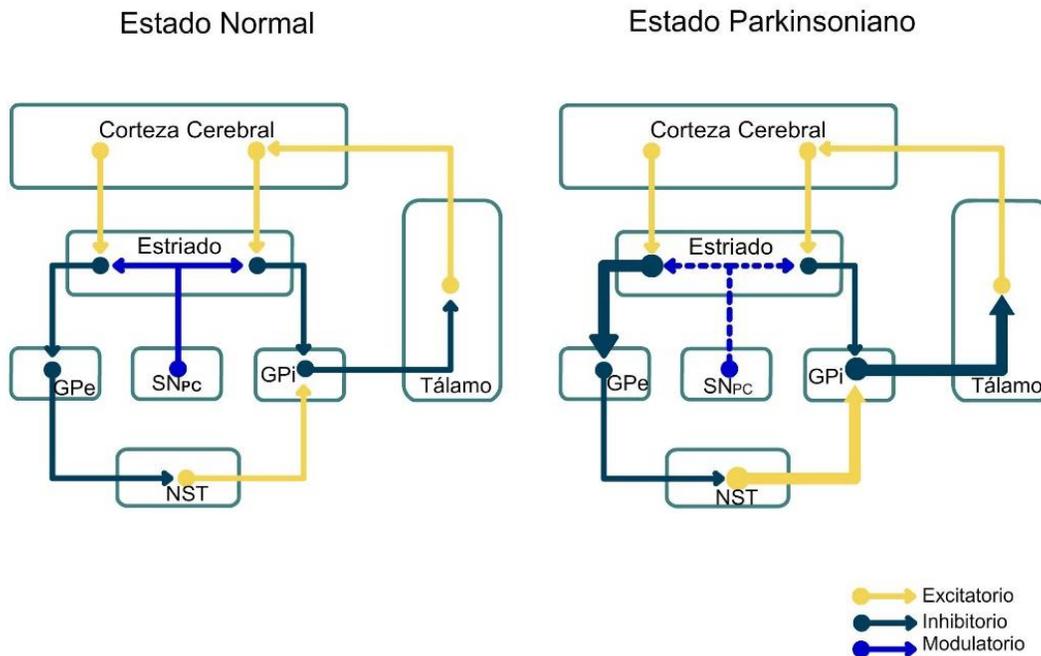
La vía nigro-estriatal es esencial para la regulación de la actividad motora, por lo que el daño en ella resulta en la EP. Los cuerpos neuronales están ubicados en el campo retrorubral (A8), la SNpc (A9) y el ATV (A10), la proyección de estas neuronas llega al estriado y a las regiones corticales límbicas y cereales. La deleción de la DA altera el equilibrio de la actividad de los ganglios basales, que incrementa la actividad del NST que sobre estimula al GPi / SNpr (Vía indirecta). El aumento de la salida de actividad del GPi / SNpr sobre inhibe la proyección tálamo-cortical, reduciendo la activación neuronal cortical asociada con la iniciación del movimiento (Lanciego J. *et al.* 2012; Graybiel A. 2000).

Los dos sub-tipos de receptores a dopamina (DA) se encuentran presentes en el estriado, los parecidos a D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub> o D<sub>5</sub>) que estimula la actividad de la adenilato ciclasa, y están localizados en neuronas GABAérgicas de la vía directa; y los parecidos a D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>), los cuales no están unidos a adenilato cilcasa, y se ubican en neuronas GABAérgicas de la vía indirecta (Saklayen S. *et al.* 2004).

Las neuronas que conforman al estriado están divididas en dos subpoblaciones, que inervan diferentes núcleos de los GB, lo que da origen a las vías indirectas y directas. La activación de la vía indirecta afecta directamente en la transmisión tálamo-cortical, debido a que inhibe a los núcleos de salida de los GB. La vía directa

ejerce un efecto contrario, ya que al aumentar la actividad en esta vía resulta en el incremento de la actividad de los núcleos de salida.

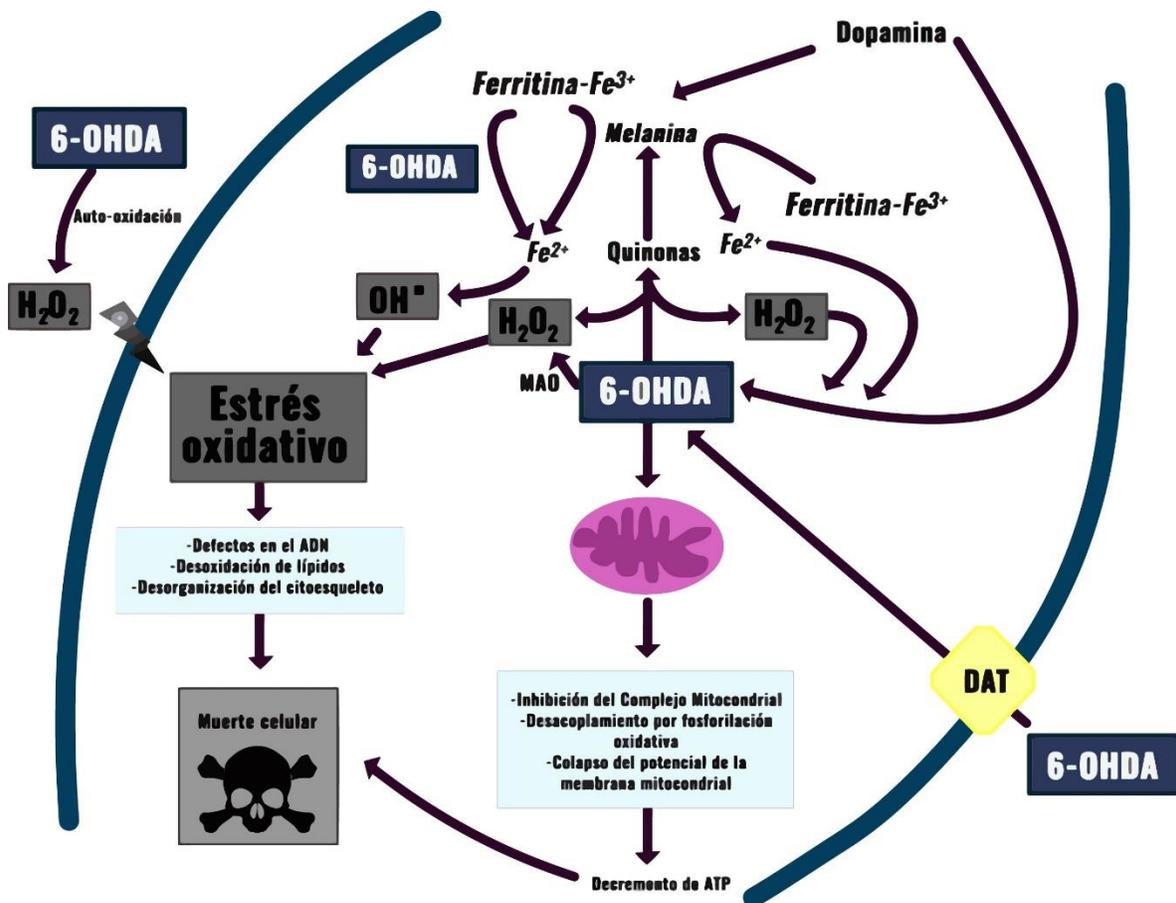
Ambas vías trabajan a la par, lo que incrementa la actividad de las neuronas tálamo-corticales, lo que da como resultado en la inhibición en general de las neuronas talámicas por medio de la vía indirecta y la excitación específica de un pequeño subconjunto de neuronas talámicas o parte de la vía directa



**Figura 3. Esquema comparativo de los ganglios basales en estado normal y con la enfermedad de Parkinson.** El circuito motor está compuesto por una proyección cortico-estriatal (putamen), dos sistemas principales de proyección estriato-fugal que dan lugar a las vías directa e indirecta, y las proyecciones eferentes pallido-talamo-corticales para cerrar el circuito motor. El grosor de las flechas representa el estado funcional de un circuito dado. Las flechas más gruesas ilustran las vías hiperactivas, mientras que las más delgadas representan circuitos hipoactivos (Tomado y modificado Lanciego, J. *et al.* 2012)

### 3.7. Modelo neurotóxico de 6-OHDA.

La neurotóxina 6-hidroxdopamina (6-OHDA) es utilizada como un modelo de degeneración dopaminérgica en roedores siendo este un modelo de EP experimental (Saito, Y. *et al.* 2007). La 6-OHDA es un análogo natural de la DA, se utiliza para realizar la lesión nigro estriatal dopaminérgica. Se administra la 6-OHDA en la SNpc, con el objetivo de realizar un daño rápido, ya que la degeneración de las neuronas se lleva a cabo en las primeras 12 horas posteriores a la lesión, resultando una pérdida de terminales estriatales en los 2-3 días posteriores a la lesión (modelo anterógrado). Al administrarse en el estriado, se crea un modelo lento, progresivo, el cual daña a la SNpc de forma retrograda en un periodo de 21 días aproximadamente (Tieu, K. 2011), representando un modelo de la EP en un estadio inicial.



**Figura 4. Mecanismo de acción de la 6-hidroxdopamina.** La 6-OHDA podría inducir la muerte celular catecolaminérgica por tres mecanismos principales: especies reactivas de oxígeno generadas por autooxidación intra o extracelular, formación de peróxido de hidrógeno inducida por la actividad MAO o inhibición directa de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos eventos conducen a un fuerte estrés oxidativo amplificado por el calcio libre citoplásmico y a una disminución en la disponibilidad celular de ATP, lo que lleva a la muerte celular (Tomado y modificado Blum, D. *et al.* 2001).

### **3.7.1. Quinonas**

La formación de metabolitos reactivos en la degradación enzimática de la DA, en una vía secundaria, afectan directamente a la célula, debido a que la DA al ser oxidada da como resultado a las quinonas de dopamina, dicha oxidación se da en los grupos alcoholes (-OH) presentes en el anillo bencénico con un grupo -OH. Según el lugar en el que se encuentre el grupo -OH, se denominan orto-quinonas y para-quinonas, de las cuales las primeras son más inestables que las segundas. Son capaces de inhibir la actividad proteica, además de un bloqueo en la cadena respiratoria, que da como resultado una disminución en la síntesis de ATP.

La melanina es sintetizada a partir de la DA, donde finalmente se forma DA-p-quinona, que es el monómero de la melanina, en esta síntesis se liberan radicales superóxido, los cuales en un ambiente de estrés oxidativo no pueden ser reducidos (López S. et al, 2008).

### **3.7.2. Estrés oxidativo causado por 6-OHDA.**

La generación de EROs como radicales hidroxilo, en conjunto con el peróxido de hidrogeno, que no es un radical libre ya que no posee electrones desapareados, son los principales responsables del daño celular, los cuales se producen por dos diferentes mecanismos, la monoamino oxidasa, la cual se inicia por la reacción de Fenton figura 2, La MAO actúa sobre la 6-OHDA lo que genera peróxido de hidrogeno. De forma paralela, la 6-OHDA se auto oxida, lo que genera quinonas, radical superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo, en la reacción de Fenton, el hierro cataliza dichas reacciones. El poder antioxidante de las células se ve comprometido, lo que causa una peroxidación lipídica. Las EROs producidas por la 6-OHDA tienen como consecuencia la ruptura de la cadena de ADN, desorganización del citoesqueleto (Blum D. *et al.* 2001).

### **3.7.3. Defectos mitocondriales causados por 6-OHDA.**

La cadena respiratoria es la primera en verse afectada por la 6-OHDA, ya que inhibe el complejo I en las mitocondrias neuronales, que es el causante de las agregaciones de  $\alpha$ -sin, lo que se lleva a cabo de forma independiente a las EROs, sin embargo, se da el colapso del potencial de membrana de la mitocondria inducido por la 6-OHDA, lo que da como resultado una incorrecta vesiculación de la DA, lo que hace que se vea aumentada en el citoplasma, que conduce a la muerte celular (Blum D. *et al.* 2001; Hernández-Montiel H. 2006).

## **4. Antecedentes.**

### **4.1. Características de las células troncales y progenitoras adultas: Fuentes de obtención de células dopaminérgicas.**

Entre las principales características de las células troncales, se encuentra la capacidad de autorrenovación, además de ser capaces de diferenciarse a diferentes linajes celulares. La autorrenovación de una célula es la capacidad de generar una célula hija idéntica a la célula madre (Weiner, L. 2008; Burgess, R. *et al.* 2014), además de poder dar lugar a células maduras las cuales ya tienen una morfología y función establecidas, por ejemplo, una célula troncal hematopoyética que produce una célula troncal de segunda generación idéntica a la primera y un osteoblasto, la cual ya es una célula madura.

Las células progenitoras adultas, son multipotentes, lo que significa que dan origen a una célula ya especializada, por ejemplo, las células que se encuentran en la médula ósea, sólo pueden dar lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas. Estas células aparecen posteriormente a una célula troncal, al terminar su división celular, una célula troncal origina a otra célula troncal idéntica, o a las células precursoras o progenitoras, después de varias rondas de mitosis, dan lugar a células diferenciadas (Chagastelles P. *et al.* 2011).

### **4.2. Terapia de Reemplazo celular.**

La terapia de reemplazo celular dopaminérgico ha sido abordada ampliamente tanto en modelos animales como en ensayos clínicos como un esfuerzo para recuperar la función que se ha perdido en la EP. Sin embargo, antes de iniciar las pruebas en modelos experimentales, es importante determinar la fuente de obtención de las células dopaminérgicas

Las células progenitoras adultas o somáticas tienen como principales características la capacidad de auto renovación y diferenciación limitada. Existen diferentes tipos, ya que depende en que tejido se encuentren, es lo que las definirá, al encontrarse en el tejido adulto, son las células encargadas del reemplazo celular dentro de los órganos durante procesos patológicos (Chagastelles P. *et al.* 2011). En trabajos previos se ha demostrado el uso de estas células para su diferenciación hacia un linaje dopaminérgico ya sea de forma *in vivo* o *in vitro*.

El grupo de trabajo de Björklund realizó un implante de células progenitoras embrionarias indiferenciadas de ratón en el estriado, en un modelo de 6-OHDA, cuyos resultados demostraron una recuperación conductual al disminuir el número de giros gradualmente a las 5,7 y 9 semanas post implante, a la par de la tomografía por emisión de positrones *in vivo* y a los datos de resonancia magnética funcional que demostraban cambios hemodinámicos mediados por DA en el

estriado y los circuitos cerebrales asociados, llegando a la conclusión que las neuronas dopaminérgicas se pueden desarrollar de forma *in situ* identificadas por marcadores dopaminérgicos como transportador de dopamina (DAT) y TH (Björklund L. *et al.* 2002).

En 2005 Takagi y colaboradores (Takagi Y. *et al.* 2005) obtuvieron células troncales embrionarias de primates no humanos en forma de neuroesferas, las cuales fueron diferenciadas a neuronas dopaminérgicas por medio de un cultivo de actividad inductora derivada de células estromales, en el cual, las células troncales embrionarias se cultivan en un cultivo plano desde células individuales, dónde por medio de inmunoreactividad positiva a marcadores neuronales específicos, las células troncales embrionarias proliferaron y se diferenciaron para la formación de colonias en la capa superficial de alimentación, posteriormente estas células son aisladas y cultivadas en una caja de cultivo no adherente con un medio rico en factores de crecimiento neuronales. Las neuronas TH (+) fueron implantadas en monos lesionados con MPTP, las células implantadas fueron capaces de disminuir los síntomas parkinsonianos en monos, como por ejemplo la postura, el balance, motilidad 10 semanas después del implante, y demostraron la importancia de utilizar FGF-2 con FGF-20 para la diferenciación hacia neuronas DA.

Trzaska y colaboradores (Trzaska K. *et al.* 2007) utilizaron células progenitoras mesenquimales provenientes de medula ósea humana para diferenciarlas a neuronas DA *in vitro*, aunque se demostró que si se pueden inducir a un linaje neural DA, se utilizó la expresión de TH para referenciar el porcentaje de diferenciación dopaminérgica, obteniendo aproximadamente un 67% de células dopaminérgicas después de 12 días de cultivo, sin embargo, son células en una etapa inmadura, ya que la expresión de los canales de  $Ca^{2+}$  y  $Na^{+}$  es baja, además de enfatizar la influencia que tiene el microambiente en el desarrollo y supervivencia neural.

Parra-Cid y colaboradores (Parra-Cid C. *et al.* 2014) utilizaron células progenitoras del sistema nervioso entérico de ratón, estas fueron implantadas en forma de neuroesferas en la SNpc de ratas que fueron lesionadas con 6-OHDA, teniendo como resultado una recuperación del 35% en la conducta motora los niveles de DA se incrementaron posterior al implante en un 34%, los niveles del metabolito secundario ácido homovanílico, de la DA se incrementó en un 21% en comparación con el grupo lesionado. lo que sugiere a las CPSNE como una posible fuente de obtención de células para el tratamiento de reemplazo celular.

### **4.3. El SNE como fuente de obtención de células troncales y progenitoras.**

El SNE es una subdivisión del sistema nervioso periférico (SNP), que tiene como principales funciones es el control de movimiento intestinal, interactuar con el sistema inmunológico y endócrino. (Furness J. 2012)

Las células progenitoras neurales son un subtipo de células progenitoras del SNE, que derivan del ectodermo embrionario (Weiner, L. 2008), que comprenden relativamente una subpoblación de células que son quiescentes, no comprometidas y multipotentes en el sistema nervioso central (Kirkham, D. *et al.* 2006).

El SNE deriva de la cresta neural y es la más compleja división del Sistema Nervioso Autónomo (SNA). El SNE es un conjunto de neuronas ubicado a lo largo del tracto intestinal, el cual puede funcionar de forma autónoma respecto al cerebro (Goyal R. 1996) Las células nerviosas y las células de la glía se encuentran en pequeños grupos, conocidos como ganglios entéricos,

En el SNE las células progenitoras dan como resultado diferentes tipos neuronales y células gliales en el tracto gastrointestinal. Los precursores neuronales y gliales migran principalmente en dirección de la parte oral hasta la anal del tracto intestinal (Rauch, U. *et al.* 2006). El proceso de la migración celular y la diferenciación está controlado principalmente por los gradientes de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

### **4.4. Neurogénesis en el cerebro adulto.**

El proceso de neurogénesis es diferente dependiendo en qué momento se lleve a cabo, ya que en la neurogénesis adulta es necesaria la protección contra las influencias anti-neurogénicas del tejido cerebral circundante y requiere el mantenimiento de un microambiente adecuado (Riquelme A. *et al.* 2008)

Además, en la neurogénesis adulta, las fases de desarrollo no son lineales, y se pueden encontrar diferentes fases al mismo tiempo en el hipocampo. Esto es debido a que la neurogénesis adulta es un proceso individual, dicho proceso se puede dividir en fases o tipos celulares, cuyos parámetros son la morfología y la expresión de marcadores neuronales específicos.

Las células de tipo 1 se encuentran en la zona subgranular (ZSG) adulta, cuya principal característica es la morfología parecida a las células de la glía radial, las cuales tienen un soma triangular, el cual se llega a ramificar y extender hasta llegar a la capa de células granulares. Expresan en gran medida GFAP, son 2/3 partes de las células que expresan Nestina. Estas células tienen una división celular asimétrica, la célula hija, que se desarrollaría en la base de la célula tipo 1, expresa nestina y se ha denominado célula tipo 2.

Las siguientes fases son transitorias, en las células de la fase 2, su núcleo es denso y las células tienen una forma irregular, en esta fase las células presentan dos subtipos, el tipo 2a es positivo a nestina y doble cortina, y el 2b, el cual es positivo a nestina y negativo a doble cortina, el cual es un marcador de neuronas inmaduras. A diferencia de los subtipos pasados, el tipo 3 es positivo a doble cortina, y negativo a nestina, la morfología se ve modificada, con un núcleo redondeado. A partir del tipo 2, se muestra la expresión de  $\text{Na}^+$  el cual es indicativo de la diferenciación neuronal.

En la fase 5 se mantiene la expresión de doble cortina, en su mayoría se alcanza esta fase 3 días después de la iniciar la división celular, 4 días posteriores a la división celular el número de células cae, para después de 2.5 semanas posteriores a la división celular el número de células se estabilice por años. En esta fase, se expresan de marcadores postmitóticos tempranos tales como la unión de la proteína calretinina a  $\text{Ca}^{2+}$ , NeuN, la morfología tiene un núcleo redondo, el cual comienza a tomar una forma triangular, y se presenta una dendrita apical.

En la fase 6, las células comienzan a expresar marcadores de maduración neurales, tales como MAP-2, NeuN, Calbidina, y ya no calretinina. La morfología ya es propia de una neurona madura (Kempermann G. *et al.*, 2004)

La incapacidad de poder generar un reemplazo celular en el tejido cerebral dañado, es un factor importante en las enfermedades neurodegenerativas (Eriksson, P. *et al.* 1998). Existen zonas específicas en el cerebro adulto de mamíferos, donde se ha registrado que en condiciones normales hay procesos de neurogénesis; las células de la Glía radial (GR) son células progenitoras neurales, las cuales se encuentran en la ZSG del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) (Lledo, P. *et al.* 2006). Las nuevas células neurales generadas migran hacia los bulbos olfatorios (BO), por medio de la vía rostral migratoria (VRM) y a las capas granulares del giro dentado (GD). Las células neuronales son componentes básicos de señalización en el sistema nervioso central, por lo que los marcadores inmunohistoquímicos han surgido como una herramienta valiosa para identificar diferentes componentes celulares que expresan un fenotipo neuronal y aún más proporcionando información sobre las características morfológicas y expresión de proteínas específicas.

La proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) es la proteína más abundante en el cerebro, formada por un hueco cilíndrico de alfa y beta tubulina. En el cerebro adulto está concentrada en las dendritas y en una baja concentración de los axones (Johnson, G. *et al.* 1992). Una de las principales funciones de MAP-2 es la extensión y ramificación de neuritas demás del estar involucrada en el cese de la división celular, procesos importantes en la maduración de las neuronas.

Existen marcadores neuronales para demostrar la neurogénesis, dependiendo del estado en el que se encuentren las células progenitoras, ya que en los primeros se expresa Sox2, proteína acida fibrilar de glía (GFAP) y Nestina, posteriormente al dividirse de forma asimétrica dan como resultado a las células de tipo 2a, 2b y 3 con características como ser GFAP (-), Nestina (+) y Doble cortina (+) (Zhang, J. *et al.* 2015).

De acuerdo a Zaho y colaboradores existen pruebas que en la SNpc hay neurogénesis, debido a que la SNpc no pierde neuronas TH+ durante el envejecimiento (Zhao, M. *et al.* 2003).

#### **4.5. Plasticidad Celular.**

Se describe a la plasticidad como la capacidad que tiene una célula progenitora adulta de un tejido u órgano para poder generar un tipo celular especializado diferente al de su origen embrionario, que pueden reemplazar a las células progenitoras de otro órgano en condiciones específicas (Filip, S. *et al.* 2005; Beltrán, O. *et al.* 2005).

La capacidad de transformación de las células troncales se observó en casos en que las células troncales de un órgano en específico, fueron capaces de producir células de diferente tipo, pero del mismo origen embrionario, es decir, células troncales pluripotentes específicas de órganos derivadas de la misma capa germinal (Filip S. *et al.* 2005).

El SNC posee la capacidad de poder adaptarse en respuesta a los cambios en su microambiente, la cual se conoce como neuroplasticidad. Dicha característica está involucrada en diferentes procesos, tales como la formación de nuevas redes neuronales (Sharma, N. *et al.* 2013), además de mejorar la atención y la conducta.

La neuroplasticidad es un proceso dinámico, el cual se desarrolla en diferentes estratos, de los cuales se puede observar en el aprendizaje y comportamiento adaptativo, el fundamento de estos cambios radica en la plasticidad de las conexiones sinápticas, las cuales están en constante reestructuración, en los que la estructura sináptica y su funcionalidad están involucradas (Gulyaeva, N. 2017).

Es importante aclarar que existe una diferencia entre los términos neuroplasticidad y neurogénesis. Ya que el primer término hace referencia al cambio en su estructura y función durante la maduración o como respuesta a una enfermedad. El segundo término refiere al nacimiento y proliferación de nuevas neuronas en el cerebro y es un mecanismo de plasticidad cerebral (Lledo, P. *et al.* 2006).

#### **4.6. La dopamina como elemento regulador de la neurogénesis.**

La DA, al igual que sus receptores, aparecen en fases tempranas en el desarrollo embrionario, esto en zonas germinales altamente proliferativas del cerebro como la ZSV. De los diferentes receptores de DA, el tipo D3 se expresa abundantemente en la ZSV embrionaria y adulta, lo que confirma la hipótesis del papel de la DA en la neurogénesis (Platel J. *et al.* 2010). La DA desempeña un papel importante en el proceso de desarrollo del cerebro en mamíferos por medio de la regulación de precursores de proliferación celulares neurales (Borta, A., *et al.* 2007). Se sabe que en pacientes que cursan con la EP, la proliferación en la ZSV se ve afectada, así como en modelos animales, en los cuales por la administración de 6-OHDA se reduce la proliferación en la ZSV en aproximadamente 30% a 45%.

#### **4.7. Dopamina en el SNE.**

Han existido evidencias indirectas acerca la presencia de DA en el SNE, entre las que se encuentra la inmunoreactividad positiva a DA en las fibras gástricas además de que la DA es liberada del estómago del cuido de Indias mediante estimulación nerviosa, inmunoreactividad positiva a transportadores de DA (DAT) entérica, en el intestino de ratón se ha encontrado el metabolito DOPAC.

En el año 2004, Li y colaboradores, por medio de inmunofluorescencias, western blot, y PCR de transcripción inversa, determinaron la expresión de marcadores dopaminérgicos como TH, DA y DAT en cerebro, estómago, duodeno, íleon, colon distal y proximal de ratón para la realización de las pruebas en las cuales dieron como resultado la presencia de RNAm de TH, siendo que las secciones de las muestras de estómago, duodeno, íleon y colon proximal expresaron una mayor cantidad de RNAm de TH en comparación con el colon distal debido a que el intestino maduro no tiene neuronas noradrenérgicas, esto es prueba de que un subconjunto de células intrínsecas es dopaminérgico. La inmunoreactividad positiva a DAT se encontró de manera significativa en la submucosa que, en el plexo mientérico del íleo y colon, lo que apoya a la hipótesis que el intestino contiene neuronas dopaminérgicas intrínsecas.

## **5. Justificación.**

De acuerdo a lo anteriormente descrito la utilización de las células progenitoras de sistema nervioso entérico tiene un gran potencial para reparar tejido en donde existe una pérdida parcial o completa de neuronas, siendo esta una herramienta prometedora para la restauración del sistema nervioso entérico y del sistema nervioso central, mediante una terapia que pueda generar la recuperación funcional en las áreas en donde existe pérdida progresiva de neuronas, tal es el caso particular de las neuronas dopaminérgicas nigro estriatales, que, durante la EP, presentan una disminución de los niveles de DA. Por lo tanto, el proponer una nueva alternativa en el estudio de la restauración o preservación de neuronas dopaminérgicas mediante el implante de células progenitoras entéricas es de gran importancia para demostrar su potencial neurogénico como modelo de reparación en sistema nervioso central.

## **6. Pregunta de investigación.**

¿Cómo se modifica la expresión de TH y MAP-2 a corto plazo por el implante de las CPSNE en la SNpc en un modelo de 6-OHDA?

## **7. Hipótesis.**

Dado que se ha demostrado que las CPSNE tienen propiedades de autorrenovación, multipotencialidad y secretar factores neurotróficos, entonces estas células serán capaces de aumentar la expresión de los marcadores TH y MAP-2 en el sitio implantado del tejido dañado por 6-OHDA a nivel de SNC.

## **8. Objetivo general:**

- ✓ Demostrar los cambios en la expresión de marcadores neuronales y dopaminérgicos postimplante a corto plazo en el modelo neurotóxico de 6-OHDA.

### **8.1. Objetivos particulares.**

- ✓ Evaluar si las células progenitoras provenientes del SNE son capaces de modificar el tejido dañado en estriado y SNpc.
- ✓ Determinar si las células progenitoras provenientes del SNE se mantienen y se diferencian en el tejido dañado del SNC.

## **9. Metodología.**

### **9.1. Animales de experimentación.**

Se utilizaron 18 ratas macho Wistar, con un peso de 250-290g, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", los cuales fueron mantenidas en cajas de acrílico ( $n = 3$  por caja), con un ciclo de luz/obscuridad 12:12, libre acceso de agua con un control de peso diario para que no sobrepasaran los 300g. El uso y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### **9.2. Tratamiento previo al análisis histológico.**

Las ratas fueron sometidas a una cirugía estereotáxica (anexo 2) donde se administró la neurotoxina 6-OHDA y que de igual forma se realizó el implante de CPSNE en la SNpc las cuales fueron (anexo 1), previamente cultivadas por 5 días.

### **9.3. Grupos experimentales.**

Las 18 ratas fueron separadas en 6 grupos experimentales ( $n = 3$ ), el grupo SHAM, al cual se le inyectó 2 $\mu$ l de ácido ascórbico (vehículo de la 6-OHDA), el grupo lesionado en el Estriado con la neurotoxina 6-OHDA (8mg/ $\mu$ l) y los grupos implantados con las células en la SNpc ( $3 \times 10^5/\mu$ l), los cuales fueron analizados a tres tiempos diferentes, 5, 10 y 15 días post-implante. Posterior a 28 días de la lesión retrograda con 6-OHDA, se realizó la conducta de giro, para evaluar el grado de lesión.

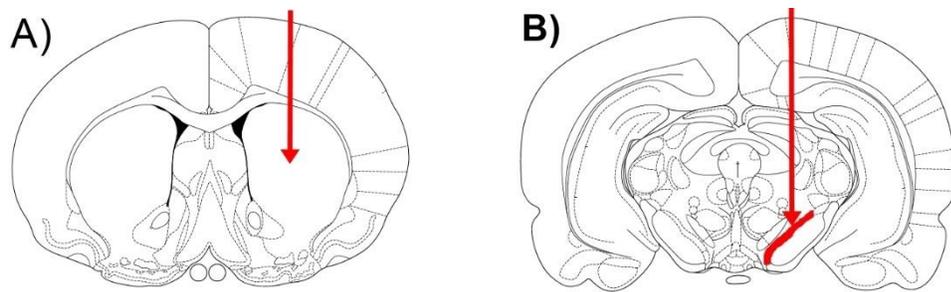
### **9.4. Obtención de muestra.**

Para la obtención del cerebro se realizó una perfusión intracardiaca administrando una sobredosis de pentobarbital sódico vía *i.p.*, posteriormente con un corte en forma de "V" en la caja torácica se localizó la vena cava inferior para realizar una incisión e introducir la aguja en el ventrículo derecho del corazón y perfundir 200 ml de PBS, 100 ml de paraformaldehído (PFA) 4% para su fijación, para finalizar con la decapitación de la rata. Se realizó una incisión antero-posterior para exponer el cráneo, con unas tijeras iris se separaron las suturas para facilitar la separación del cráneo, finalmente se insertaron unas tijeras en la parte anterior del cráneo a nivel de los ojos, para lograr abrir el cráneo sin dañar el cerebro. La extracción del cerebro se realizó inmediatamente, separando los núcleos Estriado y SNpc, dejando en PFA 4% toda la noche a 4°C.

### 9.5. Inclusión de muestra en parafina y cortes histológicos.

Al terminar el tiempo en PFA al 4% a 4°C, se colocan en PBS 1x por 30 minutos, posteriormente se utilizaron técnicas convencionales con alcoholes graduales ascendentes para su deshidratación y su inclusión en parafina.

Se realizaron cortes histológicos seriados de 7 $\mu$ m de espesor en un micrótomo Leica Mod. RM 2125, se tomó el área de la zona anterior del estriado, de entre 1.8 a -5.9mm y de -1.6 a -47.6mm para la SNpc a partir de Bregma. Se revisaron los cortes histológicos en un microscopio Zeiss Axiostar plus comparando con el manual "The rat brain in stereotaxic coordinates" (Paxinos *et al.* 1998).

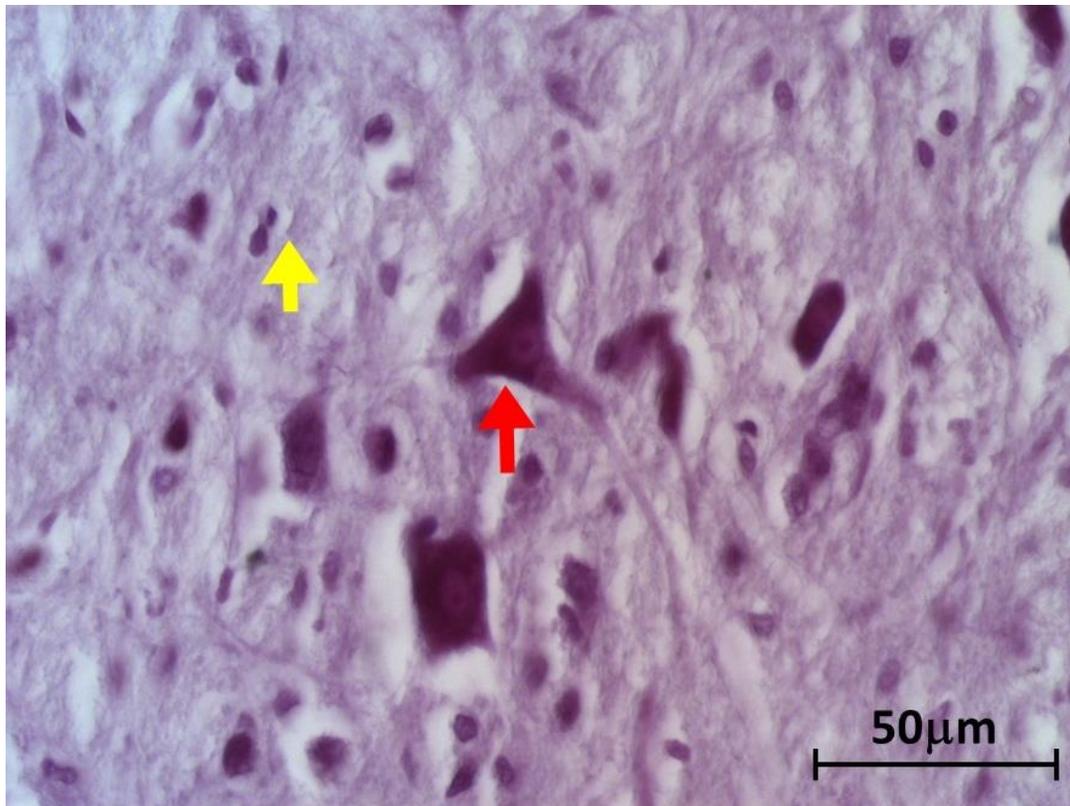


**Figura 5. Esquema de cortes coronales de cerebro de rata.** A) Se observa el estriado dorsal y el sitio de inyección de la 6-OHDA, B) Se observa en color rojo la SNpc, sitio de implante de las CPSNE (figura tomada y modificada de Paxinos and Watson, 1998).

## 9.6. Histología.

### 9.6.1. Tinción de Nissl.

Para el análisis morfológico de la SNpc y el Estriado, se realizó la tinción de Nissl. En esta tinción se utiliza un colorante básico como el violeta de cresilo, que en un medio ácido (pH=3) reacciona con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, dando como resultado la tinción de los núcleos de las células neuronales y gliales, así como la sustancia de Nissl, esta técnica tiene como característica que no tiñe los axones por carecer de ARN en su interior, además de ser una técnica utilizada para el estudio de detalles citológicos cuyo fundamento es teñir los cuerpos de Nissl, que son arreglos del retículo endoplasmático rugoso, son exclusivos de las neuronas, se encuentran cerca del aparato de Golgi (Byrne J. *et al.*, 2014).



**Figura 6. Morfología de neuronas picnóticas.** La flecha roja señala a una neurona con la morfología sin daño, en la cual se aprecia al núcleo de forma delimitada en comparación con la célula picnótica que se señala con la flecha amarilla, en la cual se observa una retracción del núcleo con condensación de la cromatina, además de una pérdida en la integridad de la membrana celular (Rembao-bojórquez D. *et al.*, 2005; Haleagrahara N. *et al.*, 2013).

Se realizó una desparafinación de las laminillas a 60°C por 30 minutos, posteriormente se realizó una rehidratación (anexo 1), después se colocó en violeta de cresilo por 20 minutos, se colocó en ETOH 100% solo por unos segundos, se pasó a Xilol para finalizar y fijar con resina.

### **9.6.2. Inmunohistoquímica para Tirosina-Hidroxilasa.**

Para evaluar la presencia de Tirosina-Hidroxilasa (TH) en las diferentes condiciones experimentales, se realizó una prueba inmunohistológica, donde por medio del marcaje con Diaminobencidina (DAB) se logra observar con un tono café denotando la presencia de TH.

La rehidratación de las laminillas con el tejido de cerebro se realizó de acuerdo al anexo 5, se colocaron las laminillas en 250 ml buffer de citratos a temperatura ambiente por 20 minutos, al concluir el tiempo se colocaron 50 µl por corte de solución de 10% metanol 3% peróxido/PBS-T con la finalidad de inhibir la peroxidasa endógena por un lapso de 30 minutos, al finalizar se realizan dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T 0.1% para dejar en anticuerpo primario TH SC-14007 Santa Cruz biotechnology [1:300] por 12 horas (toda la noche) a 4°C, concluido el tiempo se realizaron 2 lavados con PBS-T 0.1% de 5 minutos cada uno, al finalizar se coloca el Anticuerpo secundario Kit ABC Vector PK 6101 Anti-mouse IgG/Rabbit IgG [1:100] y se incubó por 2 horas a 37°C, se realizan dos lavados con PBS-T 0.1% de 5 minutos, se incubó con ABC-Streptavidina durante 30 minutos, después se realizaron 3 lavados con PBS-T 0.1% de 5 minutos, se reveló con DAB por aproximadamente 1 minuto y se realizó una contra tinción con Hematoxilina, la laminilla fue montada con resina dejando secar mínimo 24 horas a temperatura ambiente para su posterior análisis.

### **9.6.3. Inmunofluorescencia para MAP-2.**

Se realizó la desparafinación de las laminillas de ambos núcleos por 30 minutos a 60°C, posteriormente se rehidrató las laminillas (Anexo 4), se hicieron 2 lavados con PBS 1x de 5 minutos cada uno. Se permeabilizó agregando 50µl por corte de Triton X-100 al 0.5% durante 10 minutos a temperatura ambiente; al finalizar se lavaron 2 veces con PBS 1x por un tiempo de 5 minutos cada lavado. Se bloqueó con SBF al 10% en PBS durante 30 minutos. Terminado el tiempo se incubó el Anticuerpo primario mouse anti-MAP-2 monoclonal antibody millipore [1:200] diluido en SBF al 10% preparado en PBS durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x por 5 minutos cada uno, para posteriormente dejar incubando el anticuerpo secundario abcam AB6785 goat anti-mouse FITC [1:200] preparado en albumina 1% por un periodo de 2 horas a 37°C. Al finalizar se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Al finalizar se le colocó Hoescht 33342 por 1 minuto, se retiró y se agregó medio de montaje Fluoroshield (SIGMA-ALDRICH)

## **10. Análisis de resultados.**

Todas las laminillas fueron observadas en el microscopio ZEISS Axio visión vertical Imager. A1 AXIO con luz transmitida y con Fluorescencia para el análisis por densitometría. Las imágenes fueron convertidas a escala de grises y se analizó únicamente el porcentaje del área total de la micrografía con el programa ImageJ versión 1.48, las estimaciones se realizaron en 3 animales por tratamiento y en 3 cortes seriados por laminilla.

## **11. Análisis estadístico.**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$ SEM. Todos los datos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey en el programa GraphPadPrism v5.

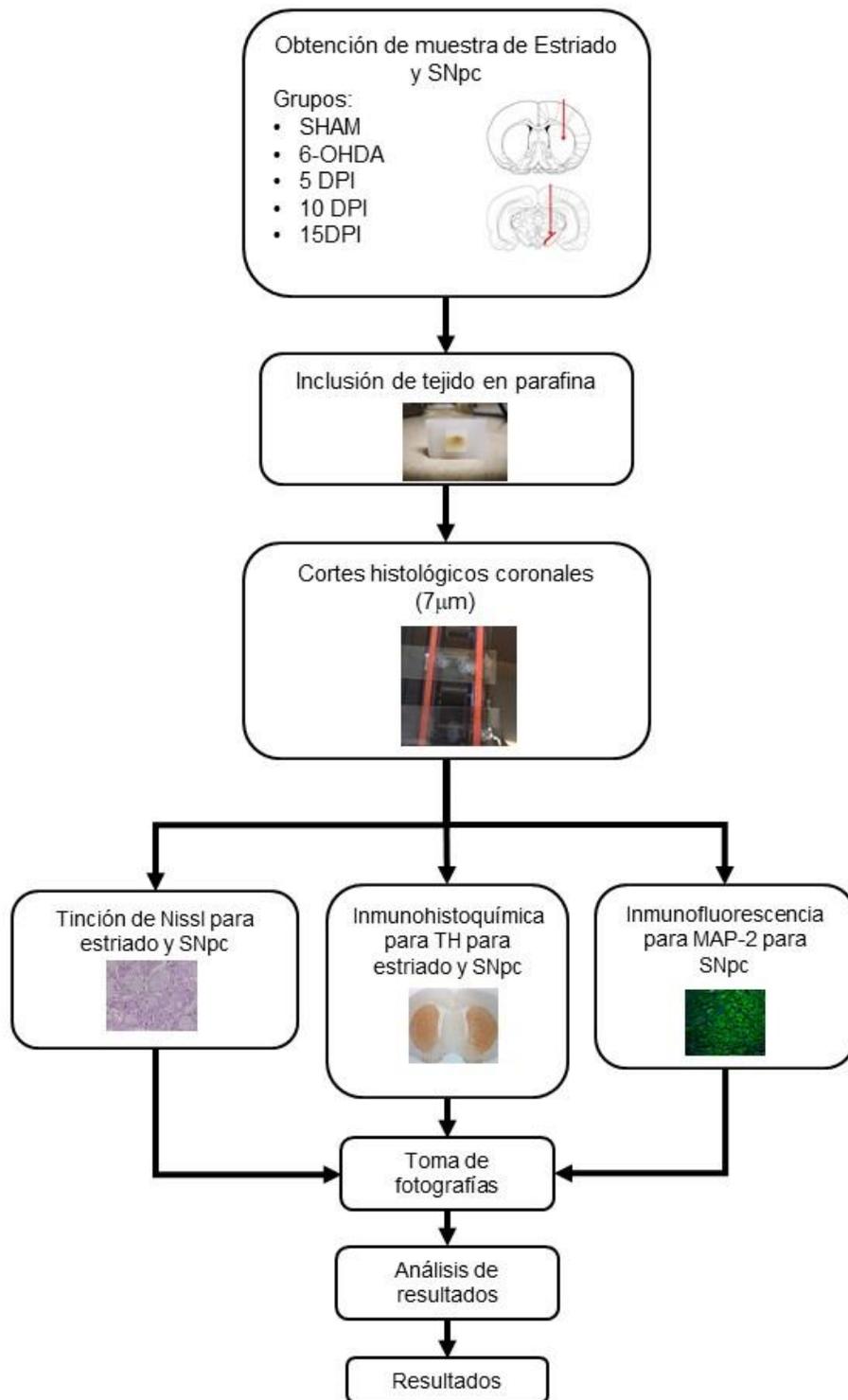


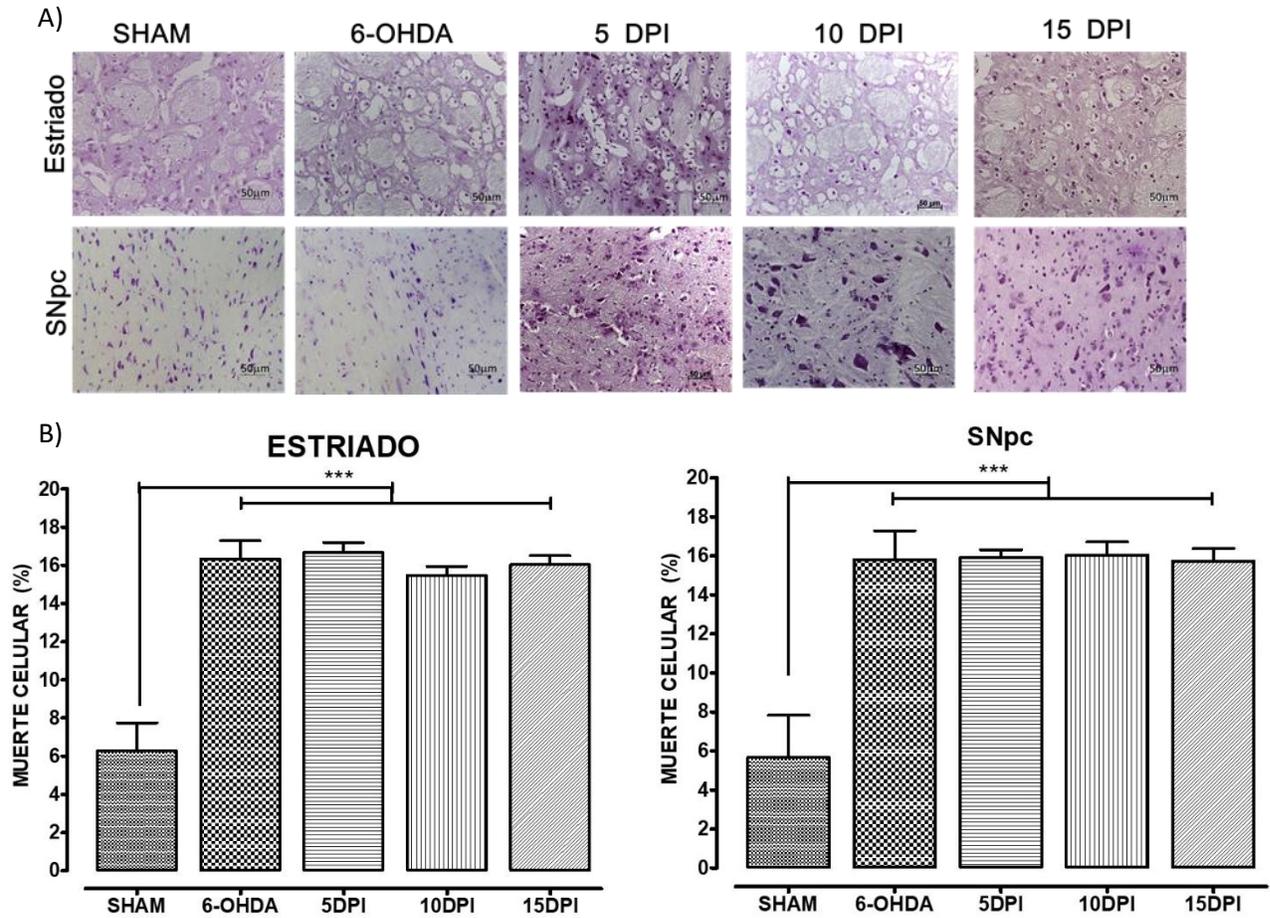
Figura 7. Diagrama general de trabajo.

## **12. Resultados.**

### **12.1. Análisis morfológico del Estriado y la SNpc.**

Para los resultados del análisis morfológico por medio de la tinción de Nissl, se muestra una desorganización del tejido dañado por la neurotoxina 6-OHDA en el Estriado, donde se observa la picnosis de las células a comparación del grupo SHAM, donde el porcentaje de picnosis es menor en comparación al grupo intacto. En los grupos implantados a 5, 10 y 15 días se observa una morfología similar al grupo 6-OHDA. En la gráfica 1, se observa que sólo hay una diferencia significativa entre el grupo SHAM con respecto a los grupos experimentales.

En la Figura 6, en la SNpc lesionada por el efecto retrogrado de la 6-OHDA, la morfología de las células DA presenta picnosis, se observa una desorganización del tejido, se pierde lo que se conoce como estela, que corresponde a la SNpc dorsal en donde se encuentra la mayor parte de las neuronas DA, en comparación del grupo SHAM, en donde se puede observar picnosis y daño celular en menor porcentaje a comparación del grupo SHAM. En los grupos implantados la morfología pareciera recuperarse después de los 10 días, sin embargo, a los 15 días es muy similar al grupo lesionado con 6-OHDA. En la gráfica 2 (refiriéndose a la SNpc) se logra ver que sólo hay una diferencia significativa entre el grupo SHAM y los demás grupos

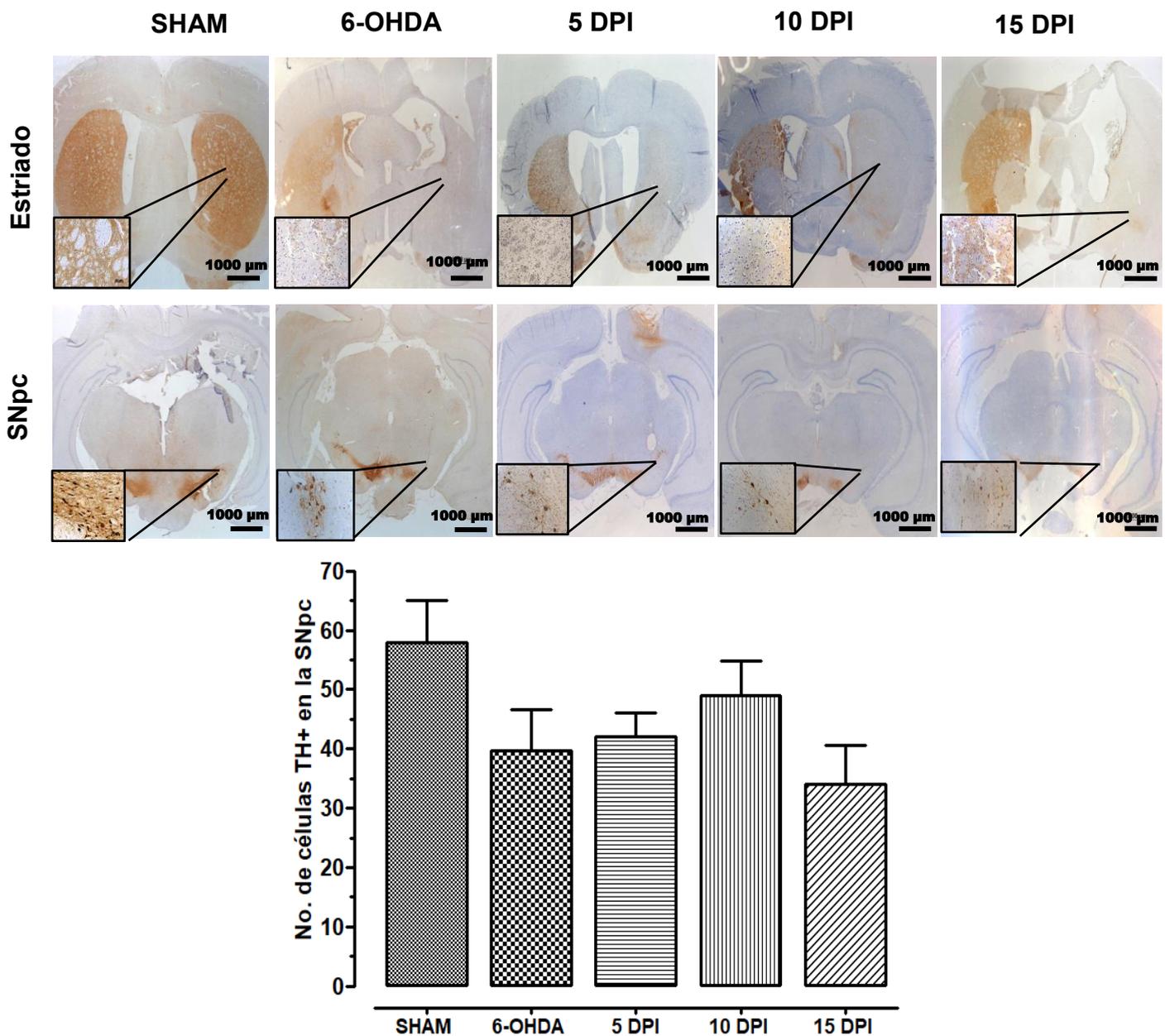


**Figura 8. Tinción de Nissl. A)** En el estriado del grupo 6-OHDA se observan células picnóticas y desorganización del tejido, este efecto se mantiene en el estriado de los grupos de 5,10 y 15 días post implante (DPI) con respecto al grupo SHAM. En la SNpc se observan células picnóticas por el efecto retrogrado de la lesión con 6-OHDA en el grupo lesionado como en los grupos de 5,10 y 15DPI con respecto al grupo SHAM, fotografías 20x. **B)** En las gráficas se muestran los cambios en el porcentaje de muerte celular tanto en estriado como en la SNpc. Para ambos casos con respecto al grupo SHAM. Se realizó un análisis de varianza de (ANOVA) para medidas repetidas, seguidos por la prueba post hoc de Tukey con una diferencia significativa de  $*p < 0.05$  con respecto al grupo SHAM

## **12.2. Análisis de la expresión de Tirosina Hidroxilasa.**

En el núcleo estriado del grupo lesionado con 6-OHDA, se nota una diferencia en cuanto al lado lesionado (derecho) en el cual no hay marcaje positivo a TH, y en lado intacto (izquierdo) se denota en color marrón, en el grupo SHAM tanto del lado lesionado como en el lado intacto se ve de color marrón. En los grupos implantados no se ve un incremento en la expresión de TH (Figura 7)

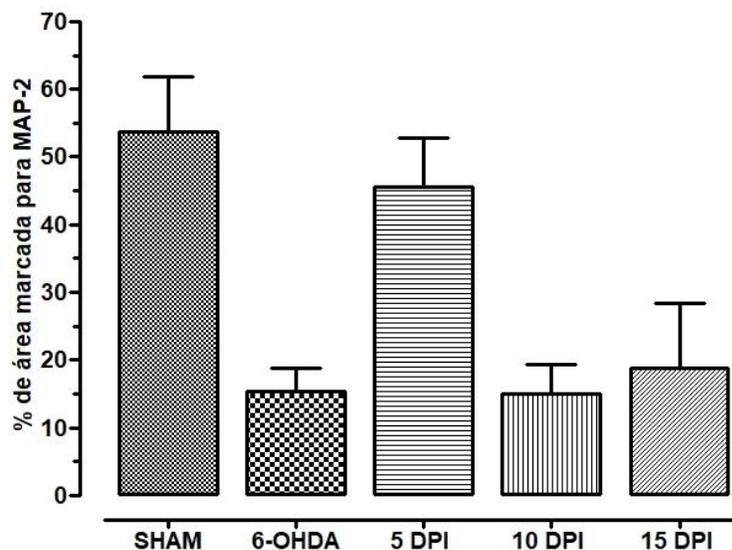
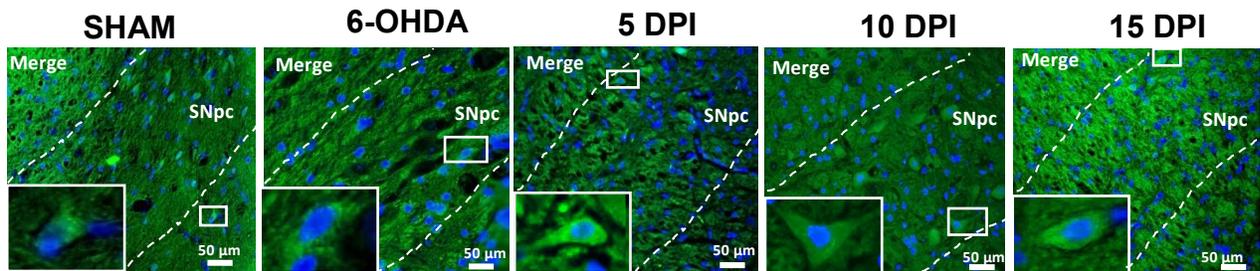
En la SNpc del grupo lesionado se ve una disminución de células a TH+ en comparación del lado intacto, en donde las células TH+ se ve la disposición de estela. En el grupo SHAM, como en el grupo Intacto, en ambos lados la coloración marrón denota las células TH+



**Figura 9. Inmunohistoquímica para TH.** Las fotomicrografías (20x) muestran las neuronas inmunoreactivas a TH en color marrón. La inyección de 6-OHDA induce la ausencia de TH en el Estriado de los diferentes grupos experimentales respecto al grupo SHAM. Mientras que en la SNpc se encontró una disminución de TH por el efecto neurotóxico retrogrado de la 6-OHDA, para los grupos implantados se encontró una tendencia a incrementarse el número de células inmunoreactivas a TH a los 5 y 10 días post implante con respecto al grupo de 6-OHDA. Se muestra la cuantificación del número de células inmunoreactivas a TH en la SNpc respecto al grupo SHAM sin cambios significativos. Prueba de ANOVA de una vía con un análisis post estadístico de Tukey ( $p < 0.005$ )

### 12.3. Analisis en la expresión de MAP-2 en la SNpc.

En el grupo lesionado con 6-OHDA se ve una disminución de células MAP-2 (+) (color verde) y núcleos teñidos con Hoescht 33342 (azul), en comparación con el grupos Intacto, en la gráfica se observa que que hay un aumento en la expresión de MAP-2 en el grupo de 5 DPI en comparación al grupo lesionado con 6-OHDA, en el grupo 10 DPI hay una disminución en comparacion con el grupo 5 DPI, sin embargo, el grupo 15 DPI parece indicar una posible tendencia en aumentar su expresión.



**Figura 10. Cambios en la expresión de MAP-2 por el implante de CPSNE.** En la SNpc lesionada por el efecto retrogrado de la 6-OHDA, se ve una disminución de células MAP-2+ en comparación del grupo SHAM e intacto. En el grupo de 5DPI, hay una tendencia a aumentar el número de células MAP-2 + en comparación con el grupo lesionado con 6-OHDA, en los grupos de 10 y 15 DPI hay una disminución de las células MAP-2+. Prueba de ANOVA de una vía con un análisis post estadístico de Tukey Fotografías 20x

### 13. Discusión.

En este trabajo quisimos demostrar los cambios morfológicos por el implante de las CPSNE, sin embargo, al realizar el análisis, encontramos que el daño por el efecto neurotóxico de la 6-OHDA, se evidencia en las neuronas dopaminérgicas, al presentar las características morfológicas de una neurona dañada con 6-OHDA, en el Estriado y la SNpc. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía ya que se observa la presencia de picnosis celular, la cual se caracteriza por la condensación de la cromatina en el núcleo celular (Martí M. *et al.* 2002). Además de observarse una desorganización del tejido tanto en estriado como en SNpc. Estudios previos (Walsh S. *et al.* 2011) han demostrado que la administración de 6-OHDA afecta a la estructura del citoesqueleto de las neuronas DA de la SNpc, al ser inyectada en el estriado, lo que da como resultado un daño estructural en el tejido. Estas características morfológicas no muestran un cambio morfológico representativo post implante principalmente en la SNpc. Por lo tanto, nuestros resultados únicamente evidencian los cambios morfológicos por el efecto de la lesión retrograda de la 6-OHDA validando el modelo neurotóxico.

En los grupos implantados se pueden ver células con una coloración azul más marcada, se sabe que el fundamento de la tinción de Nissl es el teñir mediante la incorporación del colorante básico el cual se introduce en ARMm y ARNr, lo que indica que las células teñidas fuertemente están en una gran actividad metabólica, lo que nos indica que las CPSNE siguen activas en la zona de implante (Ocampo A. *et al.* 2012).

Estudios previos (Kirik 1998) han demostrado que en el modelo de 6-OHDA, al ser administrada en el estriado causa una pérdida del 90% de la población nigral dopaminérgica, quedando un remanente de aproximadamente el 10% de neuronas dopaminérgicas, esta población de células, evita la acción tóxica de la 6-OHDA debido a que son capaces de expresar proteínas como la Calretina y Calbidina las cuales evitan la acumulación de Calcio intracelular, lo que inhibe la acción de Glutamato, esta subpoblación neuronal dopaminérgica es capaz de generar un microambiente propicio para el implante de CPSNE (Hernandez-Baltazar D. *et al.* 2017).

Por otra parte, al analizar la expresión de TH encontramos una disminución de TH en el grupo de 6-OHDA lo cual es consistente con lo reportado por Perese y colaboradores, ya que este grupo demostró la ausencia de fibras dopaminérgicas positivas a TH tanto en Estriado como en SNpc posterior a la lesión con 6-OHDA (Perese, D. *et al.* 1989). Sin embargo, nuestros resultados mostraron una tendencia al incremento de la TH entre los 5 y 10 DPI, esto posiblemente se deba a que dichas células están comenzando a diferenciarse hacia un linaje dopaminérgico, de acuerdo a lo reportado en la bibliografía, esto puede ocurrir mediante un recambio

de factores de crecimiento, tales como FGF-20, FGF-2, y FGF-8 los cuales participan en la diferenciación dopaminérgica. En el trabajo de Takagi y colaboradores, se demostró la importancia de la combinación de FGF-2 con FGF-20 para incrementar la población de células TH+ ya que promueve la proliferación de progenitores de neuronas dopaminérgicas en un cultivo de neuroesferas, el mecanismo por el cual se lleva a cabo sigue sin ser claro. Por lo tanto, FGF-2 regula el crecimiento axonal en el SNC y SNE (Hagl C. *et al.* 2013; Hagl C. *et al.* 2012), mientras que FGF-20 se encuentra en mayor proporción en la SNpc (Ohmachi S. *et al.* 2000), generando un efecto neuroprotector ante la 6-OHDA en la SNpc (Sleeman I. *et al.* 2012). Por lo tanto, creemos que un microambiente adecuado es necesario para que las CPSNE sean capaces de mantenerse, diferenciarse y proliferar ayudando así a promover la neurogénesis dopaminérgica en la SNpc.

Al analizar la expresión de MAP-2 nuestros resultados sugieren un periodo de adaptación durante los primeros 15 DPI para que se lleve a cabo la maduración de las células implantadas con linaje neuronal esto posiblemente se debe a que MAP-2 juega un papel importante en la diferenciación neuronal en la fase post mitótica madura, ya que se sabe que está relacionada con el engrosamiento de las dendritas en el proceso de maduración (Shafit-zagardo B. *et al.*, 1998).

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede determinar que las pruebas realizadas, aunque no son del todo concluyentes, nos permiten determinar el comportamiento que están siguiendo a corto plazo las CPSNE implantadas en la SNpc.

#### **14. Conclusión.**

El implante de las células progenitoras del sistema nervioso entérico no modifica la morfología de la SNpc y Estriado a corto plazo, sin embargo, son capaces de modificar la expresión de TH y MAP-2, lo cual sugiere que posiblemente estas células podrían ser una alternativa en la reparación del sistema nigro estriatal en el modelo de 6-OHDA.

#### **15. Perspectivas.**

1. Es importante determinar si las células implantadas se mantienen en el sitio implantado y si son viables mediante un marcaje celular.
2. Es necesario analizar la expresión de marcadores neuronales y dopaminérgicos a largo plazo.

## 16. Bibliografía.

- Alarcón A., *et al.*, 2010. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *REB.* 29(3): 92-100
- Avila-Luna A. *et al.*, 2014. Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. *Investigación en Discapacidad.* 3 (1): 19-24
- Bahena-Trujillo R., *et al.* 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev. Biomed.* 11: 39-60
- Baier P., *et al.*, 2004. Behavioral changes in unilaterally 6hydroxydopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells.* 22: 396-404
- Barrow T. 2015. Cell replacement therapy in Parkinson's disease. *Bioscience Horizons.* 8: 1-7
- Beltrán O., *et al.*, 2005. Plasticidad y transdiferenciación en células "stem" adultas. *Revista Med.* 13 (1): 10-16
- Betteridge D. 2000. What Is Oxidative Stress? *Metabolism.* 49 (2): 3-8
- Björklund L., *et al.*, 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *PNAS.* 99 (4): 2344-2349.
- Blum D. *et al.*, 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.* 65: 135-172
- Borah A., *et al.*, 2012. LDOPA induced endogenous 6hydroxydopamine is the cause of aggravated dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease patients. *Medical hypotheses.* 79 (2): 271-273
- Borta A., *et al.*, 2007. Dopamine and adult neurogenesis. *J. of Neurochemistry.* 100: 587-595
- Bose A. *et al.*, 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry.* 139 (1): 216-231
- Burgess R., *et al.*, 2014. Metabolic regulation of stem cell function. *Journal of Internal Medicine.* 276 (1): 12-24
- Byrne J., Heidelberger R. y Waxham, M. 2014. From molecules to networks. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, pp.31-33.
- Chagastelles P., *et al.*, 2011. Biology of stem cells: an overview. *Int. Society of Nephrology.* 1: 63-67.
- Chávez-León E., *et al.*, 2013. La enfermedad de Parkinson: neurología para psiquiatras. *Salud Mental.* 36: 315-324
- Chen Z. 2015. Cell Therapy for Parkinson's Disease: New Hope from Reprogramming Technologies Zhiguo. *Aging and Disease.* 6 (3): 499-503.

- Daubner S., *et al.*, 2012. Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 508 (1): 1-12
- Dauer W., *et al.*, 2003. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron.* 39: 889-909
- Deumens, R., *et al.*, 2002. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Experimental Neurobiology.* 175: 303-317
- Dorado-Martínez C., *et al.*, 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista Facultad de Medicina UNAM.* 46 (6): 229-235
- Eriksson P., *et al.*, 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine.* 4 (11): 1313-1317
- Filip S., *et al.*, 2005. Recent View of Stem Cell Plasticity and Stem Cell Therapy. *Časopis lékařů českých.* 12 (79): 779-784
- Filip S., *et al.*, 2005. Stem Cell Plasticity and Issues of Stem Cell Therapy. *Folia Biologica.* 51: 180-187
- Gliunka Y., *et al.*, 1996. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6Hydroxydopamine. *J. of Neurochemistry.* 66: 2004-2010
- Gómez-Chavarín M., *et al.*, 2014. Desarrollo de la vía dopaminérgica nigroestriatal. *Archivo Neurociencias (Mex).* 19 (2): 95-103
- Goyal R., *et al.*, 1996. The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* 334: 1106-1115
- Graybiel A. The basal ganglia. *Current Biology.* 10 (14): 509-511
- Gulyaeva N. Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. *Biochemistry (Moscow).* 82 (3): 237-242
- Hagl C., *et al.*, 2012. Enteric neurons from postnatal Fgf2 knockout mice differ in neurite outgrowth responses. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 170 (1-2): 56-61.
- Hagl C., *et al.*, 2013. FGF2 deficit during development leads to specific neuronal cell loss in the enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* 139: 47-57
- Harvey R., *et al.*, 2003 The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury. *Physical Medical Rehabilitation Clinics of North America.* 14: S143-S151
- He S., *et al.*, 2009. Mechanisms of Stem Cell SelfRenewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 25 (1): 377-406
- Hernández-Montiel H. 2006. Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson. *Bioquímica.* 31 (4): 146-158
- Hernandez-Baltazar D. *et al.* 2017. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología.* 32(8): 533-539

- Hernandez-Montiel H. 2006. Parkinson's disease: molecular aspects and prospective neuroprotective and restorative therapies. *Archivo Neurociencia (Mex)*. 2: 100-111
- Hu Q. *et al.*, 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*. 5 (1): 1-8
- Hwang O. 2013. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology*. 22 (1): 11-17
- Imitola J., *et al.*, Neural Stem Cells and the Future Treatment of Neurological Diseases: Raising the Standard. *De Methods in Molecular Biology*, vol. 438: Neural Stem Cells Totowa, NJ: Humana Press. 9-16
- Johnson G., *et al.*, 1992. The Role of Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) in Neuronal Growth, Plasticity, and Degeneration. *Journal of Neuroscience Research*. 33 (4): 505-512
- Kempermann G., *et al.* 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*. 27: 447-452.
- Kim J., *et al.*, Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 418 (4): 50-56
- Kirik D. *et al.* 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental Neurobiology*. 152: 259-277
- Kirkham D., *et al.*, 2006. Neural stem cells from protein tyrosine phosphatase sigma knockout mice generate an altered neuronal phenotype in culture. *BMC neuroscience*. 7: 50
- Kriks S., *et al.*, 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. 480: 547-553
- Lanciego J., *et al.*, 2012. *Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2: 1-20
- Lie D., *et al.*, 2002. The Adult Substantia Nigra Contains Progenitor Cells with Neurogenic Potential. *J. of Neuroscience*. 22 (15): 6639-6649
- LeWitt P. 2008. Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*. 359 (23): 2468-2476
- Liang G., *et al.*, 2013. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Research*. 34: 4969
- Lledo P., *et al.*, 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Neuroscience*. 7 (marzo): 179-193
- López S. *et al.* 2008. Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev. Fac Med. UNAM*. 51 (3): 104-107.

- Luthman J., *et al.*, 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations. *Behav Brain Res* 33:267-277
- Martí M. *et al.* 2002. Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. *Brain Resarch*. 958: 185-191
- Moon H. *et al.*, 2015. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology*. 24 (2): 103-116
- Napolitano A., *et al.*, 1999. New reaction pathways of dopamine under oxidative stress conditions: non enzymatic iron assisted conversion to norepinephrine and the neurotoxins 6Hydroxydopamine and 6,7dihydroxytetrahydroisoquinoline. *Chemical Research in Toxicology*. 12: 1090-1097
- Ocampo P. *et al.* 2012. Proteínas de unión con ARN, moléculas integradoras de la expresión genética. 10 (21): 23-32
- Ohmachi S., *et al.*, 2000. FGF-20, a Novel Neurotrophic Factor, Preferentially Expressed in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rat Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 277: 355-360.
- Ossing C., *et al.*, 2015 Treatment strategies in early advanced Parkinson disease. *Neurological clinics*. 33: 19-37
- Parra-Cid C., *et al.*, 2014. An enteric nervous system progenitor cell implant promotes a behavioral and neurochemical improvement in rats with a 6-OHDA-induced lesion. *Neurotoxicology and Teratology journal*. 43: 45-50
- Perese D., *et al.*, 1989. A 6hydroxydopamine induced selective parkinsonian rat model. *Brain Resarch*. 494: 285-293
- Prensa L., *et al.*, 1999. La organización compartimental del estriado humano. *Revista de Neurología*. 28 (5): 512-519
- Ramírez-García G., *et al.*, 2015. Nitrosative and cognitive effects of chronic l-dopa administration in rats with intranigral 6OHDA lesion. *Neuroscience*. 290: 492-508
- Rauch U., *et al.*, 2006. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int. J. Colorectal Dis*. 21: 554-559
- Rippon H., *et al.*, 2004. Embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 37: 23-34
- Riquelme A., *et al.*, 2008. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363: 123-137
- Rodríguez-Violante M. *et al.*, 2011. Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Archivo Neurociencia (Mex)*. 16 (2): 64-68

- Saito Y., *et al.*, 2007. Molecular mechanisms of 6hydroxydopamineinduced cytotoxicity in PC12 cells: Involvement of hydrogen peroxidedependent and independent action. *Free Radical Biology & Medicine*. 42: 675-685
- Saklayen S., *et al.*, 2004. Negative Feedback Regulation of Nigrostriatal Dopamine Release: Mediation by Striatal D1 Receptors. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 311 (1): 342-348
- Seaberg R., *et al.*, 2003 Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definition. *Trends in Neurosciences*. 26 (3): 125-131
- Shafit-Zagardo B. *et al.* 1998. Making Sense of the Multiple MAP-2 Transcripts and Their Role in the Neuron. *Molecular Neurobiology*. 16(2): 149-162
- Sharma N., *et al.*, 2013. Neural plasticity and its contribution to functional recovery. *Neurological Rehabilitation*. 110: 3-12
- Sleeman I., *et al.*, 2012. Fibroblast growth factor-20 protects against dopamine neuron loss in vitro and provides functional protection in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 63 (7): 1268-1277.
- Stefanis L. 2012.  $\alpha$ Synuclein in Parkinson's Disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2(2): a009399-a009399
- Takagi Y., *et al.*, Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. of clinical investigation*. 115 (1): 102-109.
- Tieu K. 2011. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 1 (1): 1-20
- Timmer M., *et al.*, 2006. Dopaminergic properties and function after grafting of attached neural precursor cultures. *Neurobiology of Disease*. 21: 587-606.
- Trzaska K., *et al.* 2007, Specification of a Dopaminergic Phenotype from Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 25: 2797-2808.
- Walsh S. *et al.* 2011. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*. 175: 251-261
- Weiner L., *et al.*, 2008. Neural stem cells. Totowa, NJ: Humana Press
- Zhang J., *et al.*, 2015. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Research International*. 2015: 1-14
- Zhang R., *et al.*, 2003. Migration And Differentiation Of Adult Rat Subventricular Zone Progenitor Cells Transplanted Into The Adult Rat Striatum. *Neuroscience*. 116: 373-382
- Zhao C., *et al.*, 2008. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. 132: 645-660

- Zhao M., *et al.*, 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (13): 7925-7930

## 17. Congresos.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en los siguientes congresos:



### **Caracterización del implante de células troncales entéricas en la vía nigroestriatal en un modelo de 6-OHDA**

Orozco Castillo Jesús Eduardo<sup>1,2</sup>, Díaz Alarcón Ana Cristina<sup>2</sup>, García López Julieta<sup>2</sup>, Contreras Figueroa Elena<sup>2</sup>, Ibarra Ponce de León José Clemente<sup>2</sup>, Parra Cid Carmen<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, UNAM, <sup>2</sup> Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. INR-LGII

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo progresivo, se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en Sustancia Nigra y Estriado. Ningún tratamiento restaura las capacidades nigroestriatales, ahí la importancia de desarrollar una terapia, que pueda regenerar la funcionalidad del tejido dañado. El Sistema nervioso entérico (SNE) ha sido propuesto como posible alternativa de reparación del tejido dañado, se ha demostrado la presencia de células troncales en la vida postnatal, tiene la capacidad de diferenciarse hacia neuronas y glia, nuestro objetivo es la caracterización del implante de células progenitoras del SNE (CPSNE) en la vía nigroestriatal en el modelo de 6-OHDA. Se utilizaron ratas macho wistar (n=15) divididas en grupos: SHAM, lesión 6-OHDA (Estriado), implantado (5,10 días post lesión) en SNpc, se obtuvieron los núcleos antes mencionados para su procesamiento tradicional en parafina, se efectuaron cortes histológicos (7µm), así como la tinción de Nissl para determinar la morfología celular, en las inmunofluorescencias se determinó la expresión de MAP2, y por inmunohistoquímica la expresión de Tirosin-Hidroxilasa (TH) en ambos núcleos (pruebas realizadas por triplicado y por grupo experimental). Nuestros resultados, mediante la tinción de Nissl, mostraron que no hay cambios morfológicos en la SNpc implantada con CPSNE a 5, o 10 días, sólo se aprecia el cúmulo de células implantadas. Al analizar el marcaje con MAP2, las células implantadas se mantienen, y se diferencian hacia un linaje neuronal. En la expresión de TH, se encontró una disminución de la expresión de TH en la SNpc del lado lesionado con 6-OHDA con respecto al grupo SHAM, en los grupos implantados se encontraron cambios en la expresión de TH con respecto al grupo 6-OHDA. Se concluye que el implante de CPSNE se mantiene, y se diferencia a los 10 post lesión sin cambios representativos en la morfología de la SNpc, y con la expresión de TH validamos el modelo de 6-OHDA bajo nuestras condiciones.



### **Análisis histológico de la SNpc por el implante de células progenitoras del sistema nervioso entérico.**

Parra Cid C<sup>1,7</sup>, Orozco Castillo J.<sup>6</sup>, Konigsberg Fainstein M<sup>3,7</sup>, Rodríguez Carreón A<sup>4</sup>, García López J<sup>1</sup>, Contreras Figueroa E<sup>1,5</sup>, García E<sup>2</sup>, Ruiz Contreras H<sup>1</sup>, Santamaría del Ángel A<sup>2</sup>, Ibarra C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, INR-LGII, <sup>2</sup>Lab de Aminoácidos Excitadores-INNN, <sup>3</sup>Lab. de Bioenergética y Envejecimiento Celular, <sup>4</sup>Centro de Investigación en Salud Poblacional-INSP, <sup>5</sup>Bioterio, INR-LGII, <sup>6</sup>Facultad de Ciencias-UNAM, <sup>7</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

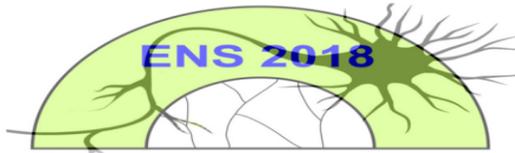
**Introducción.** El sistema nervioso entérico se origina de la cresta neural durante el desarrollo embrionario al igual que el sistema nervioso central, por lo que existen células progenitoras del sistema nervioso entérico (CPSNE) en la etapa post natal que han sido propuestas como posible alternativa de reparación de tejido dañado por su multipotencialidad. **Objetivo.** Analizar histológicamente el implante de las CPSNE en la Sustancia nigra *pars compacta* (SNpc). **Material y métodos.** Se utilizaron ratas macho Wistar ( $n=18$ ) las cuales fueron divididas en: grupo Intacto, SHAM, lesión con 6-OHDA (lesionando estriado). 28 días post lesión se realizó la conducta de giro para evaluar el efecto tóxico de la 6-OHDA. El grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA fue implantado con las CPSNE ( $3 \times 10^5$  c/2  $\mu$ l) en la SNpc, las ratas fueron sacrificadas a los 5, 10 y 15 días post implante (DPI). El análisis histológico se realizó mediante la tinción de Nissl, inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa (TH) y MAP-2. **Resultados** Se realizó el análisis morfológico con la tinción de Nissl para determinar el daño celular, encontramos cambios en la organización del tejido así como picnosis por el efecto tóxico de la 6-OHDA. En los grupos implantados no se encontró una diferencia significativa en la expresión de TH respecto al grupo 6-OHDA. La expresión de MAP-2 se vio incrementada a los 5 DPI, mientras que a los 10 y 15 DPI hubo un decremento en la expresión de MAP-2 respecto al grupo 6-OHDA. **Conclusión.** El implante de CPSNE se mantiene y se diferencia a los 5 días post implante sin presentar cambios representativos en la morfología y expresión de TH en la SNpc.

### **El implante de células progenitoras entéricas modifica la expresión de marcadores neuronales en el modelo de 6-OHDA.**

Orozco Castillo Jesús Eduardo<sup>1,2</sup>, Díaz Alarcón Ana Cristina<sup>2</sup>, García López Julieta<sup>2</sup>, Contreras Figueroa Elena<sup>2</sup>, Hipolito Aliossha Ruiz Contreras<sup>2</sup>, Ibarra Clemente<sup>2</sup>, Parra Cid Carmen<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, UNAM, <sup>2</sup> Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. INR-LGII

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la Sustancia Negra par compacta (SNpc) y disminución de los niveles de dopamina Estriatal. Hasta el momento ningún tratamiento farmacológico restaura la vía nigroestriatal, de ahí la importancia de desarrollar una terapia de reemplazo que ayude a recuperar la funcionalidad del tejido dañado. Las células progenitoras del Sistema Nervioso Entérico (CPSNE) pueden ser una posible alternativa por sus propiedades de autorenovación y multipotencialidad. Por esta razón, si las CPSNE tuvieran la capacidad de reparar el tejido dañado a nivel de sistema nervioso central, éstas serían una posible alternativa en la reparación o preservación de neuronas funcionales en la EP. Objetivo: Determinar si el implante de células progenitoras del SNE modifican la expresión de marcadores neuronales en el modelo de 6-OHDA. Metodología: Se utilizaron ratas macho Wistar ( $n=15$ ), estas fueron lesionadas mecánicamente y con 6-OHDA en el estriado, estas fueron divididas en: Sham, lesión con 6-OHDA y 6-OHDA más células (en SNpc). 28 días post lesión se realizó la conducta de giro para evaluar el efecto de la 6-OHDA, 33 días post lesión fueron implantadas las células en suspensión (las células fueron obtenidas 5 días previos al implante) en la SNpc para el grupo experimental, para el grupo SHAM y 6-OHDA solo se administró el vehículo de las células. Las ratas fueron llevadas a punto final en grupos de tres a los 5,10 y 15 días post implante. Se realizó la tinción de Nissl para determinar el daño celular, se determinó la expresión de MAP-2 y Tirosina-Hidroxilasa (TH). Resultados: Al analizar los cerebros implantados encontramos que, con Nissl, no hay cambios morfológicos por el implante de CPSNE a los 5, 10 y 15 días post implante. Al analizar la expresión de TH para el grupo de 6-OHDA disminuyó, sin cambios en los grupos implantados con respecto al grupo Sham. Las células implantadas se mantienen y se diferencian hacia neurona (MAP-2) a los 5 y 10 días post implante, mientras que a los 15 días la expresión de MAP-2 disminuye de manera representativa. Conclusión: Por lo tanto, el implante de CPSNE se mantiene y se diferencia a los 5 días post implante sin cambios representativos en la morfología y expresión de TH en la sustancia nigra.



ENS

April 8-11, 2018

5th International  
Symposium

Royal Sonesta Hotel  
Boston, MA USA

### Enteric neural progenitor cells as potential alternative in the repair of the nigrostriatal pathway in the 6-OHDA model in rats.

Alfonso Carreón-Rodríguez<sup>1</sup>, Carmen Parra Cid<sup>2,3</sup>, Eduardo Orozco Castillo<sup>3,6</sup>, Mina Konigsberg Fainstein<sup>5</sup>, Esperanza García<sup>4</sup>, Julieta García López<sup>3</sup>, Elena Contreras Figueroa<sup>3</sup>, Abel Santamaría del Ángel<sup>4</sup>, Clemente Ibarra<sup>3</sup>

1. National Institute of Public Health, Cuernavaca, Mexico; 2. Experimental Biology Postgraduate Program, Autonomous Metropolitan University, Mexico City; 3. National Institute of Rehabilitation, Mexico City; 4. National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City; 5. Autonomous Metropolitan University, Mexico City; 6. School of Sciences, UNAM, Mexico City.

**Introduction.** Enteric Nervous system progenitor cells (ENSCs) are a potential alternative to regenerate dopaminergic neurons lost in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum, which cause Parkinson's disease (PD). However, it remains unclear whether these cells are functional and able to repair tissue *in vivo*. Therefore, if ENSCs own the ability to repair damaged tissue in the central nervous system, they would be a promising tool during the PD cell replacement therapy.

**Purpose.** The objective of this work is to evaluate if the enteric nervous system progenitor cells transplant is capable of repairing damaged tissue in the SNpc in a 6-OHDA-induced injury model.

**Methodology.** Myenteric plexus from jejunum was obtained from newborn Wistar rats (1 day of age). The tissue was digested enzymatically then cultured in proliferation media for five days to grow neurospheres (NF's). The NF's were characterized for stem cell markers (SOX-2, GFAP, nestin, and MAP-2). Lesions in the striatum were induced both mechanically and by 6-OHDA in male adult Wistar rats. At day 28 post-injury, turning behavior was determined to assess the effect of 6-OHDA. NF's were transplanted in the SNpc at 33 days post-injury in the experimental group, then the rats were euthanized on 5, 10 and 15 days post-transplant (dpt). The dopaminergic phenotype post-transplant was evaluated by the expression of MAP-2, tyrosine-hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT).

**Results.** Characterization of NF's showed the expression of SOX-2, GFAP, MAP-2 and nestin in 8.2%, 14%, 17% and 6.6% of cells. MAP-2 and TH neurons were identified at 5, 10 and 15 dtp.

**Conclusion.** In our conditions, transplanted ENSCs survive and differentiate into dopaminergic phenotype. Our results suggest that ENSCs could be a potential source of stem cells for the cell replacement therapy in PD.



## Células progenitoras entéricas como una alternativa en la reparación de la vía nigroestriatal en el modelo de 6-OHDA

(1) Parra Cid María del Carmen, (3) Carreón Rodríguez Alfonso, (4) Konigsberg Mina, (2) Esperanza García, (1) García López Julieta, (1,5) Orozco Castillo Jesús Eduardo, (1) Ruíz Contreras Hipólito, (1) Contreras Figueroa Elena, (2) Santamaría del Ángel Abel, (1) Clemente Ibarra.

(1) Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII, (2) Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, (3) Instituto Nacional de Salud Pública, (4) Universidad Autónoma Metropolitana, (5) Facultad de Ciencias, UNAM.

**Área:** Biomédica

**Antecedentes.** La Enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en Sustancia Negra pars compacta (SNpc) y Estriado. El tratamiento farmacológico es limitado, por lo que existe la necesidad de tratamientos alternativos. Una posible alternativa, es la utilización de células progenitoras de sistema nervioso entérico (CPSNE) ya que pueden diferenciarse hacia neurona y glía. Sin embargo, aún no es claro si estas células son funcionales y capaces de reparar tejido *in vivo*. Por esta razón, si las CPSNE tienen la capacidad de reparar el tejido dañado a nivel de sistema nervioso central, éstas serían una herramienta prometedora en la terapia de reemplazo celular para la EP.

**Objetivo.** El objetivo de este trabajo es demostrar que el implante de células progenitoras del sistema nervioso entérico es capaz de reconstituir el tejido dañado de la SNpc en un modelo de lesión con 6-OHDA.

**Material y métodos.** Se utilizaron ratas neonatas Wistar de 1 día de edad, se llevaron a punto final para la obtención del musculo del duodeno, este fue procesado mediante digestión enzimática para la obtención de neuroesferas (Nfs), las cuales se mantuvieron con Neurocult suplementado con EGF, FGFb, heparina 2% y antibiótico al 0.1% por 5 días a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. El cultivo dividió en: Etapa 1) se determinó la proliferación con BrdU y viabilidad con calceína, las Nfs fueron caracterizadas con marcadores de troncalidad (SOX-2, GFAP, Nestina y MAP-2). Etapa 2) a los 5 días las células fueron procesadas para obtener alícuotas de una suspensión de 3x10<sup>5</sup> c/2µl para su posterior implante. Previamente un grupo de ratas macho wistar (n = 15) fueron lesionadas mecánicamente y con 6-OHDA en el

striado, estas fueron divididas en: SHAM, lesión con 6-OHDA y 6-OHDA más células (en SNpc). 28 días post lesión se realizó la conducta de giro para evaluar el efecto de la 6-OHDA, 33 días post lesión fueron implantadas las Nfs en la SNpc para el grupo experimental, para el grupo SHAM y 6-OHDA sólo se administró el vehículo de las Nfs. Se realizó la tinción de Nissl para determinar el daño celular, se determinó la expresión de MAP-2 y Tirosina-Hidroxilasa (TH).

Resultados. Nuestros resultados mostraron que las Nfs indiferenciadas expresaron un 8.2% de SOX-2, 14% de GFAP, 17% de MAP-2 y 6.6% de Nestina. Al analizar los cerebros implantados encontramos que con Nissl no hay cambios morfológicos por el implante de CPSNE a los 5, 10 y 15 días post implante. Para el grupo de 6-OHDA, TH disminuyó sin cambios en los grupos implantados con respecto al grupo SHAM.

Conclusión. Las células del SNE expresan marcadores de troncalidad y al ser implantadas éstas se mantienen y se diferencian a los 10 y 15 días post implante sin cambios representativos en la morfología de las células y expresión de TH en la SNpc, por lo que las CPSNE podrían ser una posible fuente de obtención de células troncales para la terapia celular en la EP.

## CARACTERIZACION DEL IMPLANTE DE CELULAS PROGENITORAS ENTERICAS EN EL MODELO DE 6-OHDA EN RATA

Parra Cid María del Carmen<sup>1</sup>, Orozco Castillo Jesús Eduardo<sup>1,3</sup>, Díaz Alarcón Ana Cristina<sup>1</sup>, García López Julieta<sup>1</sup>, Contreras Figueroa Elena<sup>1,2</sup>, Ruiz Contreras Hipolito Aliossha<sup>1</sup>, Ibarra Clemente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, INR-LGII, <sup>2</sup>Bioterio, INR-LGII, <sup>3</sup>Facultad de Ciencias, UNAM., México D.F. Enfermedades Neurodegenerativas.

La Enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en Sustancia Negra par compacta (SNpc) y Estriado, el modelo de 6-OHDA es una herramienta experimental para entender la etiología de esta enfermedad. Se ha descrito que las células progenitoras neuronales del Sistema Nervioso Entérico (CPSNE) pueden diferenciarse hacia neurona y glía y que tienen la capacidad de reparar tejido dañado. El objetivo de este trabajo es caracterizar el implante de células progenitoras del SNE en el modelo de 6-OHDA en rata. Se utilizaron ratas macho Wistar ( $n=15$ ) divididas en: Sham, lesión 6-OHDA(estriado),6-OHDA más células (SNpc). Se realizó la tinción de Nissl para determinar la morfología y muerte celular, se determinó la expresión de MAP-2 y Tirosina-Hidroxilasa(TH).Nissl mostró que no hay cambios morfológicos por el implante de CPSNE a los 5, 10 y 15 días post implante, las células implantadas se mantienen y se diferencian hacia neurona (MAP-2) a 10 y 15 días post implante. Para el grupo de 6-OHDA TH disminuyo sin cambios en los grupos implantados con respecto al grupo Sham. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  S.E.M, se utilizó una "t" de student y una prueba post hoc de Tukey. El implante de CPSNE se mantiene y se diferencia a los 10 y 15 días post implante sin cambios representativos en la morfología de la SNpc y expresión de TH. Estos resultados muestran que las células progenitoras del SNE pueden mantenerse, proliferar y diferenciarse hacia un linaje neural en la SNpc.



El Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México  
El Consejo Nacional de Certificación en Medicina Veterinaria y Zootecnia A.C.  
La Asociación Mexicana de la Ciencia de los Animales de Laboratorio A.C.

Otorgan la presente reconocimiento al Tercer lugar a:

***Parra Cid María del Carmen***

No. de Registro ConcerVet: ALD10/17



En la categoría de neurociencias por su cartel:

**Caracterización del implante de células progenitoras entéricas en el modelo de 6-OHDA en rata.**

Co-Autores: Orozco Castillo Jesús Eduardo, Díaz Alarcón Ana Cristina, García López Julieta, Contreras Figueroa Elena, Ruiz Contreras Hipólito Aliosseha, Ibarra Clemente

Dentro del XI Congreso Internacional de la Asociación Mexicana de la Ciencia de los Animales de Laboratorio  
Del 11 al 13 de Septiembre 2017. Juriquilla-Querétaro, México

M.V.Z. Francisco Ruiz  
Presidente  
AMCAL

M.V.Z. Martín García Servín  
Presidente Comité Organizador  
Instituto de Neurobiología-UNAM-AMCAL

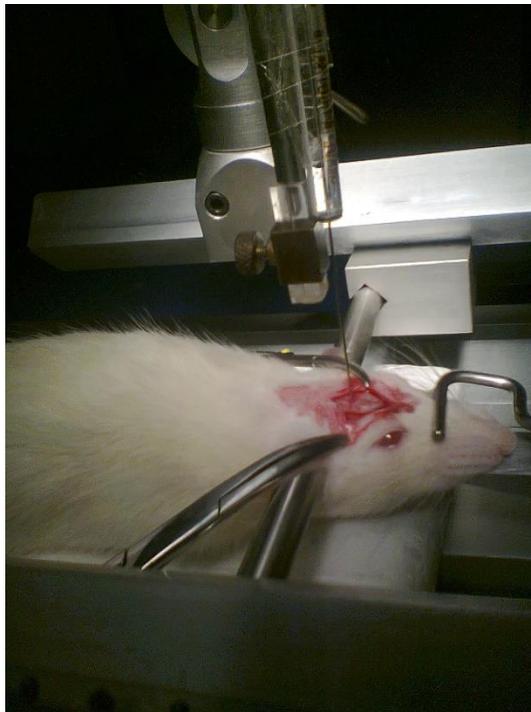
## **18. Anexos.**

### **Anexo 1. Cultivo en suspensión.**

Se utilizaron ratas neonatas de la cepa Wistar de 1 día de edad (n=12 ratas por cultivo). Los animales fueron decapitados para retirar el yeyuno y parte del colón; se separaron mecánicamente las dos capas mucosa-submucosa y el musculo, el tejido muscular fue lavado con PBS/antibiótico al 10% (Gibco). Posteriormente se fragmento el tejido mecánicamente para ser procesados mediante digestión enzimática con una combinación de Dispasa tipo I (0.1mg/ml, Gibco), Colagenasa tipo XI (750 U/ml, Sigma) y DNasa I (10mg/ml), en agitación constante durante 15 minutos a 37°C<sup>17</sup>. Después de la digestión enzimática se realizaron dos lavados con PBS, la suspensión celular se hizo pasar a través de un colador celular con malla de nylon de 40µm de poro (BD Falcon), se realizó el conteo celular mediante exclusión de azul tripano y se sembraron 7x10<sup>5</sup>cel/ml en cajas individuales de baja adherencia (Corning) con medio de proliferación para células troncales que contiene medio NeuroCult con 10% de medio de proliferación (StemCell Technologies) suplementado con heparina al 0.0002% (StemCell Technologies), EGF (20 ng/mL), bFGF (10ng/mL)(StemCell Technologies) y antibiótico/antimicótico al 0.1% (Gibco). Las colonias flotantes fueron mantenidas por 5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## Anexo 2. Cirugía estereotáxica

Las ratas adultas fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina (95mg/kg/5mg/kg respectivamente vía i.p. Las ratas se asignaron al azar y se formaron dos grupos experimentales (primer grupo n=3 y segundo grupo n=6). Se utilizó un aparato estereotáxico para la denervación dopaminérgica en estriado dorsal con coordenadas: antero posterior (AP) -1.0 mm de bregma, lateral (L) -2.8 mm a la línea media, dorso ventral (DV) -4.7 con respecto a la dura madre (según el atlas de PaxinosyWatson<sup>13</sup>). Al primer grupo Sham se le administro 2  $\mu$ l de ácido ascórbico al 0.01% (vehículo de la 6-OHDA), mientras que al segundo grupo se le administró 2  $\mu$ l de 6-OHDA (8 $\mu$ g/ $\mu$ l, Sigma Aldrich) disuelta en ácido ascórbico al 0.01% (Gibco). La inyección fue realizada a través de una micro-jeringa de 10 $\mu$ l (Hamilton) a una velocidad de 0.5 $\mu$ l/minuto, se dejó la aguja *in situ* durante 5 minutos, posteriormente la cánula fue retirada. Después de la cirugía, todos los animales fueron colocados en un colchón térmico y mantenidos a 37°C para minimizar la hipotermia hasta su recuperación total.



### Anexo 3. Deshidratación e inclusión de cerebro en parafina.

Paso	Reactivo	Concentración	Agitación	Tiempo	Temperatura
1	PFA	4%	-----	24Hrs.	4°C
2	PBS	1x	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
3	Etanol	50%	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
4	Etanol	70%	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
5	Etanol	80%	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
6	Etanol 1	96%	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
7	Etanol 2	96%	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
8	Etanol	100%	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
9	Etanol nuevo	100%	75 r.p.m.	1 hora	Temperatura ambiente
10	Xilol 1	-----	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
Revisar que las muestras se vean transparentes; si no regresar a etanoles.					
11	Xilol 2	-----	75 r.p.m.	30 min.	Temperatura ambiente
12	Parafina 1	-----	A mano	1 hora	60°C
13	Parafina 2	-----	A mano	2 horas	60°C
14	Parafina 3	-----	A mano	3 horas	60°C
Inclusión en moldes					
Dejar que se solidifique a temperatura ambiente y después pasar a -20°C por 5 min. y retirar el molde con cuidado.					

#### **Anexo 4. Protocolo de deshidratación de laminillas.**

\*Desparafinar a 60°C por 30 minutos

\*Dejar enfriar para comenzar con el proceso

<b>SOLUCIÓN</b>	<b>TIEMPO</b>
Xilol 1	5 minutos
Xilol 2	30 segundos
ETOH 100% Anhídrido 1	30 segundos
ETOH 100% Anhídrido 2	30 segundos
ETOH 96% 1	30 segundos
ETOH 96% 2	30 segundos
ETOH 80%	30 segundos
ETOH 70%	30 segundos
ETOH 60%	30 segundos
ETOH 50%	30 segundos
Agua bi-destilada 1	30 segundos
Agua bi-destilada 2	5 minutos

## **Anexo 5. Tinción de Nissl; preparación de reactivos.**

Violeta de Cresilo Acetato Sigma

0.1g. de Violeta de Cresilo acetato en 100ml de agua bidestilada

Se prepara en la campana de flujo laminar, al preparar se coloca 300µl de ácido acético glacial.

Después de seguir el protocolo de rehidratación, se deja en Violeta de cresilo, previamente filtrado, por 20 minutos.

\*\* Se pasa por ETOH 100% #1

\*\* Se pasa por ETOH 100% #2

\*\* Sumergir en Xilol #2

Montar con resina.

\*\*Sumergir hasta que deje de "lagrimear", que es, que salga limpia la laminilla sin residuos del reactivo.

## **Anexo 6. Inmunohistoquímica. Preparación de soluciones**

*Buffer de Citratos:*

*Solución A:* Stock ácido 0.114 de ácido cítrico

Peróxido de hidrógeno 3%/Metanol 10%PBS-T:

500µl Metanol + 500µl Peróxido + 4ml PBS-T

*PBS-T 0.1%*

200mlPBS + 200µl Triton

*Solución de bloqueo (Kit):* 3.5ml PBS-T + 1gota de suero (50µl)

*Anticuerpo primario*TH [1:200] en PBS-T

*Anticuerpo secundario biotinilado* [1:100] Kit rabbit en solución de bloqueo.

*Streptavidin:* ABC Kit rabbit.

1000µl PBS= 10 µl A+ 10 µl B + 980 PBS

5ml PBS= 1 gota A+ 1gota B

*DAB*= 20 µl (1 gota) en 1 ml de Buffer.

Preparación de buffer de citratos 10mM pH6

Solución A stock ácida 0.1M Ácido cítrico  $C_6H_8O_7$  Peso molecular 192.13 g/mol  
Amresco

Pesar 0.10g y disolver inicialmente en 3 ml de agua bidstilada para llevarlo a 5 ml de volumen final.

Solución B Stock básica 0.1M de Citrato de Sodio  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  Peso molecular 294.1 g/mol Sigma

Pesar 0.58g y disolver en 15ml de agua bidestilada y llevar a un volumen final de 20ml.

3.6ml de sol. A + 150ml de Agua bidestilada + 20ml de sol. B y aforar a 200ml

Ajustar pH a 6

.

## **Anexo 7. Preparación de soluciones Inmunofluorescencia Map-2**

*Triton X-100 al 0.5% en PBS*

50µl de Triton X-100 diluidos en 10ml de PBS 1x

*Suero Bobino Fetal (SBF) al 10% en PBS*

1ml de SBF en 10ml de PBS 1X

*Albumina al 1% en PBS*

0.1 g de Albumina en 10ml de PBS 1x