

124  
2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSPLANTES DE CELULAS CROMAFINES  
DIFERENCIADAS CON NGF O CAMPOS MAGNETICOS Y SU EFECTO SOBRE LA CONDUCTA DE GIRO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON.

T E S I S  
Que para obtener el Título de:  
B I O L O G O  
p r e s e n t a  
CONSUELO MORGADO VALLE

Director de Tesis: Dr. Rene Raul Drucker Colín

México, D. F.



Octubre de 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



## **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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1a. pasante(s) CONSUELO MORGADO VALLE

con número de cuenta 8718738-2 con el Título:

TRANSPLANTES DE CELULAS CROMAFINES DIFERENCIADAS CON NGF O CAMPOS  
MAGNETICOS Y SU EFECTO SOBRE LA CONDUCTA DE GIRO EN UN MODELO DE  
ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DR.	RENE RAUL	DRUCKER COLIN	
Director de Tesis			
DR.	ROBERTO	SANCHEZ OLEA	
DRA.	MA. LUISA	FANJUL DE MOLES	
M. EN IBB	CLAUDIA	GONZALEZ ESPINOSA	
Suplente			
DR.	JESUS MANUEL	LEON CAZARES	
Suplente			

**Dedico esta tesis con especial cariño a mis padres**

**CAYETANA VALLE ARELLANO  
y ANTULIO MORGADO ESTRADA**

**por el apoyo moral y económico y el cariño que me han  
brindado incondicionalmente.**

**A mis hermanos**

**ANTULIO, EFRAIN, IRIS y ALEJANDRO**

**esperando que cada uno, en su camino encuentre la felicidad.**

**A mis amigos de años: ANGELICA, ROSA y ERNESTO  
A FABIO que, aunque no es de años, es un gran amigo.**

**Y especialmente a**

**LUIS BELTRAN PARRAZAL**

**quien a través de estos años me ha apoyado, criticado e  
impulsado para ser cada día mejor. Porque la lucha es contra  
uno mismo. Esta es una de las muchas metas que nos faltan  
por conquistar.**

**Agradezco muy sinceramente**

**al DR. RENE DRUCKER COLIN**

**por brindarme la oportunidad de colaborar en su laboratorio, por su apoyo y confianza. "La ciencia demanda del hombre gran esfuerzo y suprema pasión".**

**Gracias a los del equipo:**

**LETICIA VERDUGO, FERNANDO CARBAJAL, ANABEL JIMENEZ, ADALBERTO DURAN, JACKIE VAZQUEZ**

**por compartir el tiempo, el espacio y el conocimiento, y por esas horas en el Barring House.**

**A JOSE LUIS MENDOZA, por todo el conocimiento transmitido.**

**A TERE TORRES por la paciencia y buen humor.**

**A ADRIANA RIVERA por las pláticas amenas.**

**A JESUS MENDEZ y FELIX SOSA.**

**A MILAGROS MENDEZ y JUAN FERNANDEZ porque dejaron huella.**

**A todos aquellos que forman parte de este laboratorio.**

# INDICE

## INTRODUCCION

Ganglios Basales.....	1
Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.....	15
Transplantes en la enfermedad de Parkinson.....	22
Efectos tróficos.....	32
Campos magnéticos.....	38
OBJETIVO.....	42
METODOS.....	43
RESULTADOS.....	50
DISCUSION.....	58
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69

## INTRODUCCION

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa descrita en 1817 por el fisiólogo inglés James Parkinson. Los principales síntomas clínicos de esta enfermedad son temblor de reposo, rigidez, pérdida de la expresión facial, bradicinesia, acinesia y en casos severos demencia. La enfermedad comienza típicamente después de los cincuenta años, y tiene un curso progresivo lento.

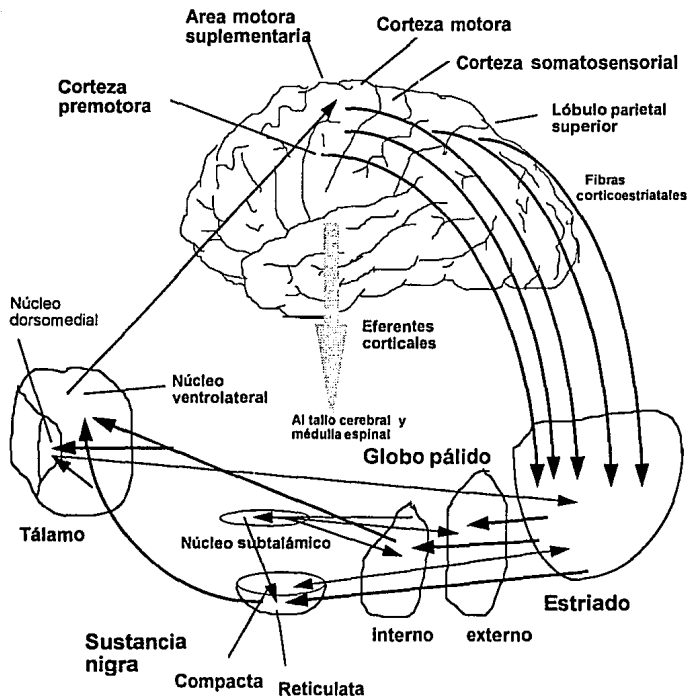
Los estudios postmortem de pacientes con enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington, revelan cambios patológicos en los ganglios basales, los cuales están correlacionados con las alteraciones motoras en estas enfermedades. Estos problemas motores son de tres tipos: alteraciones hipercinéticas tales como la corea, el balismo y otros movimientos involuntarios; alteraciones hipocinéticas como la acinesia, bradicinesia y la rigidez y finalmente la distonia (Albin y cols, 1989). Por estas observaciones clínicas, los ganglios basales han sido considerados un centro de integración y planeación del movimiento, tanto voluntario como involuntario, y el estudio de su anatomía y fisiología ha cobrado especial importancia.

Los ganglios basales constan de cinco núcleos subcorticales interconectados: núcleo caudado, putamen, globo pálido, núcleo subtalámico y sustancia nigra (Fig. 1). El

núcleo caudado y el putamen derivan de la misma estructura telencefálica por lo que están constituidos de tipos celulares idénticos y se encuentran fusionados anteriormente. El caudado medial y el putamen anterior se encuentran divididos por las fibras de la cápsula interna. Ambos núcleos constituyen el neostriado o estriado y son los núcleos de aferencia de los ganglios basales. El globo pálido (o simplemente pálido) deriva del diencefalo. Se encuentra medial al putamen y lateral a la cápsula interna y esta dividido en dos segmentos: interno y externo. El núcleo subtalámico se encuentra debajo del tálamo en la región de unión con el mesencéfalo. La sustancia nigra está ubicada en el mesencéfalo y consta de dos zonas: una ventral, pálida, llamada *pars reticulata*, parecida citológicamente al globo pálido y una zona dorsal, pigmentada que contiene neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares tienen neuromelanina, un polímero derivado de la dopamina, por lo que es llamada *pars compacta*. El globo pálido y la sustancia nigra *pars reticulata* constituyen los mayores núcleos eferentes de los ganglios basales (Carpenter, 1984).

Casi todas las conexiones aferentes de los ganglios basales terminan en el neostriado, el cual recibe entradas desde la corteza cerebral y el núcleo intralaminar del tálamo. La entrada más importante es la proyección corticoestriatal, la cual contiene fibras de toda la corteza, incluyendo áreas motoras, sensoriales, de asociación y





**Figura 1.** Los ganglios basales comprenden cinco núcleos subcorticales: caudado-putamen (estriado), globo pálido, núcleo subtalámico y sustancia nigra. En esta figura se ilustran las conexiones existentes en el circuito motor de los ganglios basales. Existe una retroalimentación desde áreas motoras y somatosensoriales de la corteza hacia los ganglios basales y el tálamo y de regreso a la corteza premotora, motora y al área motora suplementaria.

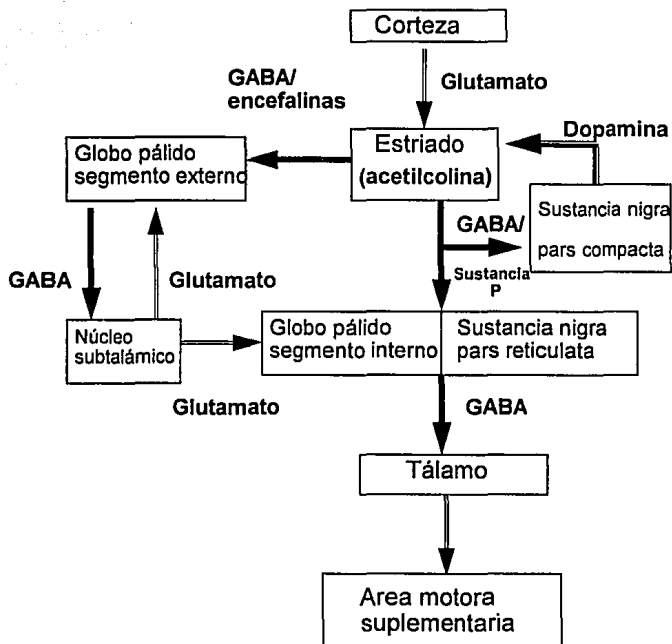
límbicas. El neocestriado se encuentra organizado en dos tipos de compartimentos especializados neuroquímicamente, definidos por la intensidad de la tinción histoquímica para acetilcolinaesterasa y por la distribución heterogénea de receptores a  $\mu$ -opioides (Graybiel, 1990). Los estriosomes se encuentran embebidos en la matriz. Ambos compartimentos tienen diferentes conexiones. La matriz recibe aferentes corticales y proyecta al pálido y a la sustancia *nigra pars reticulata*. Los estriosomes reciben aferencias de la corteza prefrontal y límbica y emiten proyecciones a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* .

Las células del neocestriado proyectan al globo pálido (vía estriatopalidal) y a la sustancia *nigra* (vía estriatonigral). El núcleo subtalámico recibe proyecciones del segmento externo del globo pálido y emite proyecciones hacia ambos segmentos de éste y hacia la sustancia *nigra pars reticulata*. También recibe entradas desde la corteza motora y premotora. El segmento interno del globo pálido y la *pars reticulata* de la sustancia *nigra* proyectan a tres núcleos en el tálamo: el ventrolateral, el ventroanterior y el mediodorsal. Estas porciones del tálamo proyectan a la corteza prefrontal, a la corteza premotora, al área motora suplementaria y a la corteza motora. De este modo los ganglios basales influyen de manera indirecta los sistemas corticoespinal y corticobulbar. Una proyección de la sustancia *nigra pars reticulata* hacia el colículo superior

influye sobre el movimiento de los ojos

Aquellas porciones de la corteza cerebral más cercanamente relacionadas con el control del movimiento tienen proyecciones bien organizadas hacia la porción motora del putamen. Sin embargo, los ganglios basales no tienen un papel importante en la iniciación de movimientos provocados por un estímulo y no especifican directamente las fuerzas musculares necesarias para la ejecución de movimientos. Quizá los ganglios basales facilitan algunos movimientos y suprimen otros y pueden participar en la iniciación de movimientos generados internamente. Esta última posibilidad es consistente con la inhabilidad para iniciar movimientos (acinesia) que exhiben los pacientes con enfermedad de Parkinson.

Existen dos vías en la circuitería motora de los ganglios basales. La vía directa es la proyección estriatal al segmento interno del globo pálido y a la sustancia nigra pars reticulata, los cuales proyectan después al tálamo. La vía indirecta es la proyección del neostriado hacia el segmento externo del globo pálido el cual proyecta al núcleo subtalámico. El núcleo subtalámico proyecta hacia el globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticulata (Fig. 2)



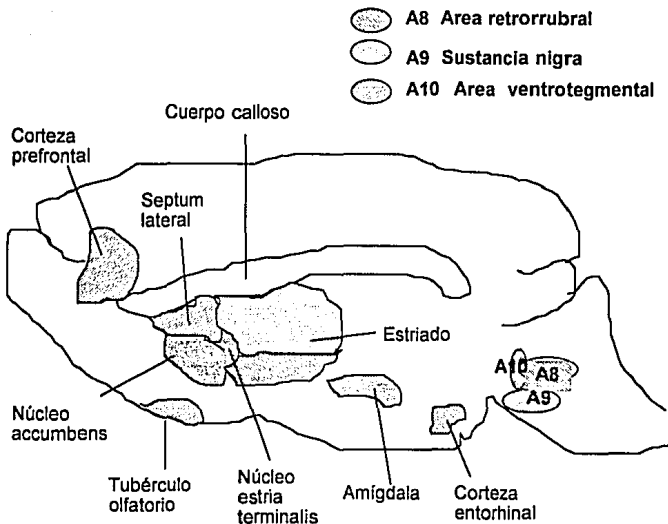
**Figura 2.** Existen dos vías en el circuito motor de los ganglios basales. La vía directa está mediada por GABA y Sustancia P y la indirecta por GABA y encefalinas. Las flechas negras representan vías inhibitorias y las blancas excitatorias, además se mencionan los neurotransmisores empleados en cada vía. (GABA: ácido gama-amino butírico).

La vía directa es inhibitoria y está mediada por GABA y sustancia P. El movimiento resulta cuando las células talámicas son liberadas de su inhibición tónica. La activación de las neuronas talamocorticales facilita el movimiento al excitar el área motora y el área motora suplementaria. En la vía indirecta la excitación corticoestriatal da como resultado la inhibición del segmento externo del pálido (mediada por GABA y encefalinas) y una desinhibición del núcleo subtalámico mediada por GABA. El núcleo subtalámico excita por glutamato al segmento interno del globo pálido y a la sustancia nigra pars reticulata, los cuales inhiben al tálamo, disminuyendo la excitación del área motora suplementaria.

Las entradas corticales al estriado son excitatorias y parecen estar mediadas por glutamato, por lo que esta vía podría, en general excitar a las neuronas estriatales (Graybiel, 1990). El estriado inhibe por sí mismo a sus tres áreas primarias de proyección, áreas que a su vez inhiben al tálamo. De este modo, la activación cortical desinhibe al tálamo (Chevalier y Deniau, 1990). Las vías de proyección cortical hacia el estriado, el pálido y el tálamo se encuentran organizadas somatotópicamente, por lo que es posible que, para una conducta motora particular, sean desinhibidas subpoblaciones neuronales talámicas específicas. Debido a que las proyecciones talámicas excitan a la corteza cerebral, se establecería un circuito mediado por los

ganglios basales, que facilitaría la actividad cortical.

La proyección dopaminérgica de la sustancia nigra tiene efectos en el neocórtex. La dopamina excita la vía directa e inhibe la vía indirecta. La vía directa parece facilitar el movimiento al excitar el área motora suplementaria y la vía indirecta tiene el efecto opuesto, por lo que la dopamina facilita el movimiento actuando en ambas vías. Las enfermedades del metabolismo de los neurotransmisores, como la enfermedad de Parkinson, o lesiones en esta área, pueden desajustar el equilibrio en el que se encuentran ambas vías (Fig. 3). Dependiendo del sitio de la alteración, pueden producirse movimientos involuntarios, o acinesia y bradicinesia. La acinesia se ha atribuido clásicamente a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, lo que da como resultado la disfunción de los mecanismos estriatopalidales. Al existir una disminución en los niveles dopaminérgicos, la acinesia puede surgir como resultado de un incremento en la inhibición tónica de las neuronas tálamo-corticales, lo que provoca una disminución de la respuesta de las áreas corticales que normalmente participan en la iniciación del movimiento, hacia sus aferentes. La bradicinesia puede ser resultado del incremento de los niveles de inhibición en las estructuras de los ganglios basales que emiten eferentes al tálamo, dando como resultado una actividad excesiva tónica y fásica en la vía indirecta y por consiguiente un incremento en la



**Figura 5.** Representación esquemática de las proyecciones eferentes de los grupos celulares dopaminérgicos A8, A9 y A10. Las neuronas de A8 inervan sitios estriatales y mesolímbicos, las células de A9 inervan principalmente al estriado y A10 inerva también áreas mesolímbicas como el núcleo accumbens, los tubérculos olfatorios y la amígdala, así como la corteza prefrontal. El patrón de sombreado indica el patrón de inervación.

retroalimentación negativa en las áreas motoras precentrales. (DeLong, 1990).

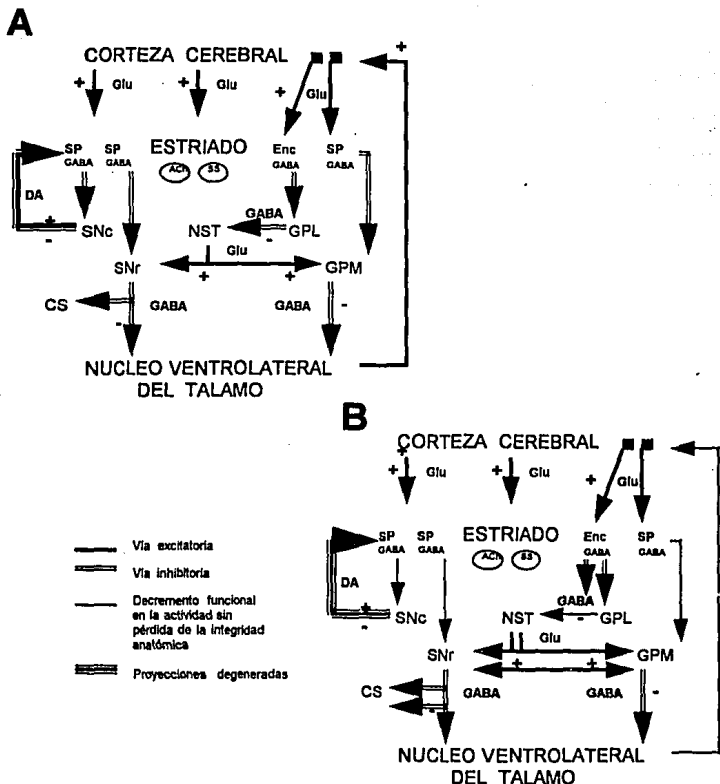
La principal característica neuropatológica de la enfermedad de Parkinson es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Dichas neuronas emiten sus prolongaciones al estriado, por lo que su muerte causa una deficiencia de dopamina en el estriado. Una característica neuropatológica adicional es la presencia de cuerpos de Lewy, descritos por Lewy en 1912. Se trata de inclusiones neuronales citoplasmáticas, redondas, eosinófilas, que exhiben típicamente un halo periférico (Langston y cols, 1987). Además de estos cambios morfológicos existen una serie de cambios a nivel bioquímico, tales como una reducción de dopamina y sus metabolitos en el núcleo caudado, reducción de acetilcolina y de las enzimas que la sintetizan en el núcleo basalis y una disminución en la concentración de encefalinas, colecistoquinina, sustancia P y somatostatina (Drucker-Colín, 1989).

Durante la década de 1940, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson se utilizaban diferentes procedimientos quirúrgicos incluyendo lesiones destructivas del tracto piramidal a varios niveles, del globo pálido y del tálamo (Drucker-Colín, 1989). En la década de 1950, Carlsson observó que un 80% de la dopamina del cerebro se encuentra en los ganglios basales y reportó la efectividad de



la L-dopa para revertir el parkinsonismo inducido por reserpina en ratas. En 1967 Cotzias utilizó la L-dopa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La L-dopa es un aminoácido, precursor inmediato de la dopamina que, a diferencia de ésta, si atraviesa la barrera hematoencefálica (Fig. 4). La dopamina es sintetizada en el estriado, en las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran en la sustancia nigra. En la enfermedad de Parkinson cerca del 90% de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales han degenerado.

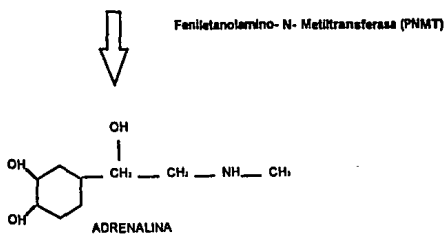
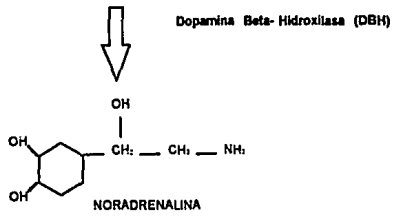
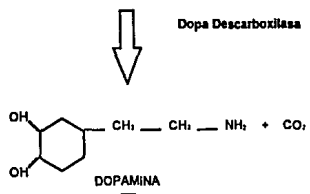
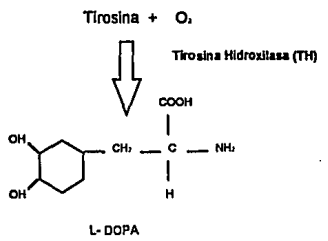
El sistema dopaminérgico nigroestriatal es anatómica, bioquímica, electrofisiológica y farmacológicamente heterogéneo. En el estriado existen dos patrones de inervación distintos, los estriosomas y la matriz. Ambos exhiben diferentes actividades basales y responden de diferente manera a los agonistas y los antagonistas dopaminérgicos. Así mismo, el incremento y acumulación de metabolitos de dopamina en el estriado provocado por drogas antipsicóticas y el incremento en la síntesis de dopamina por neurolépticos muestran una variabilidad regional. Se observa un incremento de la síntesis de dopamina en respuesta a drogas antipsicóticas en el sector dorsomedial rostral del estriado, mientras que la cola ventrolateral del estriado tiene una menor respuesta. Las áreas del estriado que muestran un alto grado de cambio en la síntesis o concentración de metabolitos, reciben inervación



**Figura 3.** En estos diagramas se representan los circuitos excitatorios (flechas negras) e inhibitorios (flechas blancas) de los ganglios basales en condiciones normales (A) y en la enfermedad de Parkinson (B). **A:** Normal.- Este diagrama representa las proyecciones estriatales de sus subpoblaciones hacia diferentes núcleos utilizando distintos neuropéptidos. **B:** Enfermedad de Parkinson.- Se muestra la degeneración de la SNc y los cambios en la actividad de las subpoblaciones neuronales de proyección estriatal. Las proyecciones estriatales al GPL se vuelven más activas, mientras que las proyecciones al GPM y a la SNr son menos activas. La pérdida de la entrada GABAérgica estriatal y el incremento de la entrada excitatoria del núcleo subtalámico dan como resultado un incremento en la actividad del GPM y la SNr y una inhibición de las neuronas de proyección talamocortical. Simultáneamente existe una inhibición del colículo superior. (ACh: acetilcolina; DA: dopamina; Enc: encefalinas; GABA: ácido gama-amino butírico; GLU: glutamato; GPL: Globo pálido lateral; GPM: Globo pálido medial; CS: colículo superior; SNc: sustancia nigra *pars compacta*; SNr: sustancia nigra *pars reticulata*; NST: núcleo subtalámico; SP: sustancia P; SS: somatostatina).

dopaminérgica de las regiones mediales o centrales del grupo celular A9; las áreas que exhiben baja respuesta son predominantemente inervadas por A10 y A8 (Fig. 5). Aquellas áreas con una respuesta intermedia reciben una mezcla de entradas de A9 y A10 (Revisado por Roth y cols, 1987).

Estos datos sugieren asimismo que debe existir una variabilidad regional de las respuestas bioquímicas en las diferentes regiones mesencefálicas que proyectan a los diversos sectores estriatales. La heterogeneidad en la sustancia *nigra* es evidente en el modelo animal de enfermedad de Parkinson. La administración a primates de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) provoca parkinsonismo por un decremento selectivo de los niveles de dopamina estriatal, pero no mesolímbica. Las neuronas dopaminérgicas de la zona lateral de A8 y en la parte central de la sustancia *nigra* parecen ser preferencialmente vulnerables a la neurotoxicidad por MPTP, mientras que las neuronas mediales de la sustancia *nigra* son menos susceptibles a esta neurotoxina. Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* lateral parecen no ser dañadas por MPTP. Tales observaciones sugieren que ciertas características de los axones dopaminérgicos que inervan al estriado aumentan la susceptibilidad de las neuronas al MPTP (Deutch y cols, 1986). De este modo, las subpoblaciones dopaminérgicas nigrales pueden ser definidas con criterios anatómicos, bioquímicos y farmacológicos.



**Figura 4.-** Vía de síntesis de las catecolaminas. La Tirosina Hidroxilasa es el enzima limitante de la vía; cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la Tirosina. La Dopa Descarboxilasa cataliza la eliminación de un grupo carboxi; la Dopamina Beta-Hidroxilasa une un grupo hidroxilo al carbón beta de la cadena lateral de la dopamina y la Feniletanolamino-N-metiltransferasa transfiere un grupo metil al nitrógeno de la noradrenalina formando una amina secundaria.

Por sus características clínicas y patológicas, la enfermedad de Parkinson es una entidad bien definida que no debe ser confundida con el parkinsonismo, término que se refiere a cualquier condición que exhiba señales clínicas similares a las observadas en la enfermedad de Parkinson, incluyendo enfermedades infecciosas, toxinas y drogas. El parkinsonismo es inducido por cualquier agente que interfiera con la vía nigroestriatal y afecte la producción, almacenamiento, secreción o reconocimiento del receptor de dopamina (Langston y cols, 1987). Algunos agentes farmacológicos (como reserpina o  $\alpha$ -metiltirosina) pueden inducir parkinsonismo, al afectar la síntesis, almacenamiento o receptores del neurotransmisor. La acción parkinsónica de estos agentes es reversible, ya que pueden ser eliminados por degradación enzimática o excreción. Una condición de parkinsonismo irreversible puede ser provocado por neurotoxinas, las cuales actúan causando muerte neuronal, razón por la cual se han convertido en una útil herramienta en el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

#### **Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson cuenta actualmente con modelos experimentales bien caracterizados en animales. Dado que varias evidencias han puesto de manifiesto que la dopamina es el neurotransmisor clave en el control de la actividad motora y que uno de los sitios que contiene la más alta concentración de dopamina en el cerebro es el

neocestriado (complejo caudado-putamen), Andén y colaboradores reportaron en 1966 que una lesión en este sitio provoca una conducta de giro. Desde entonces han sido variados los métodos empleados para inactivar los componentes estriatales en animales, abarcando desde aspiración y lesiones electrolíticas hasta la inyección de soluciones hipertónicas de KCl.

La desaferentación unilateral del estriado produce un desequilibrio en la actividad dopaminérgica en ambos lados lo que da como resultado una conducta de giro. Una técnica muy útil ha sido la lesión directa de varios sitios de la vía ascendente nigroestriatal. Para tal efecto pueden ser empleadas dos tipos de lesiones: una lesión electrolítica o una lesión inducida por la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). La lesión electrolítica provoca una destrucción no específica de todas las células (neuronas, glía y tejido conectivo) alrededor de la punta del electrodo. La extensión del daño está en relación directa a la magnitud y tiempo durante el cual la corriente eléctrica es aplicada. Se pueden lograr lesiones más selectivas infundiendo volúmenes pequeños de soluciones que contengan sustancias neurotóxicas para sistemas específicos de neurotransmisores. La neurotoxina más usada comúnmente para crear modelos de conducta de giro es la 6-OHDA, sustancia que provoca muerte celular selectivamente a las neuronas catecolaminérgicas del cerebro (Ungerstedt, 1968). La selectividad de cualquier neurotoxina parece variar

de acuerdo al sitio de inyección, al volumen, concentración e ingredientes del vehículo y de los antioxidantes.

La inyección de 6-OHDA en la sustancia nigra causa una degeneración de la vía nigroestriatal ipsilateral y una disminución en las concentraciones de dopamina en el estriado ipsilateral. En los modelos animales en donde se realiza lesión del sistema nigroestriatal, la conducta de giro parece ser el reflejo de un desequilibrio en los mecanismos dopaminérgicos, por lo que las drogas dopaminérgicas potencian el giro, y provocan que los animales giren hacia el lado de menor actividad dopaminérgica. Después de la inyección de 6-OHDA en la vía nigroestriatal, la rata exhibe conducta de giro y una asimetría corporal hacia el lado lesionado. (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Esta actividad inicial desaparece y el animal aprende a compensar esta conducta, la cual reaparece sólo cuando es colocado en un nuevo ambiente o sometido a estrés. También se ha observado que la inyección intraestriatal de 6-OHDA produce una degeneración retrógrada de las neuronas nigroestriatales (Berger y cols, 1991).

Hefti y colaboradores (1980) demostraron que en las lesiones en que han sido destruidas por lo menos dos terceras partes de las neuronas nigroestriatales, las neuronas que sobreviven aceleran la síntesis y secreción de dopamina, y que sólo se produce una sensibilización de los receptores

postsinápticos estriatales cuando han sido destruido un 90% o más de neuronas nigroestriatales.

La administración de drogas que manipulan los mecanismos dopaminérgicos centrales, como anfetamina y apomorfina reactivan la conducta de giro. Estas drogas han sido clasificadas en tres tipos: a) drogas que afectan presinápticamente los sistemas dopaminérgicos, como el caso de las anfetaminas, las cuales provocan la liberación de dopamina y otras monoaminas desde las terminales nerviosas centrales y son clasificadas como agonistas dopaminérgicos indirectos. La aplicación de anfetaminas en roedores con lesión nigroestriatal unilateral provoca una conducta de giro ipsilateral a la lesión, de manera dosis dependiente (Andén, 1970). Al parecer, la anfetamina libera la dopamina del estriado contralateral e incrementa el desbalance del sistema dopaminérgico estriatal, lo que provoca que el animal gire hacia el lado de menor actividad dopaminérgica. La intensidad de la rotación inducida es proporcional al grado de pérdida de la función del estriado ipsilateral a la lesión, y se requiere una reducción del 50% de dopamina estriatal para que esta conducta aparezca (Hefti y cols, 1980). Sin embargo, el giro no es tan marcado como el que producen los agonistas dopaminérgicos de acción directa. Se sabe que participa un mecanismo presináptico ya que, en animales lesionados, el pretratamiento con un inhibidor de la tirosina hidroxilasa, el cual bloquea la síntesis de dopamina (y noradrenalina),



inhibe la conducta de giro inducida por anfetamina. Otra droga utilizada es la reserpina, la cual interfiere con el almacenamiento de monoaminas, provocando una liberación de neurotransmisor, su administración aguda induce en ratas con un estriado lesionado, giro y asimetría corporal contralateral a la lesión. La cocaína es un inhibidor de la recaptura de catecolaminas en la terminal nerviosa; administrada en combinación con un inhibidor de la monoamino oxidasa, esta droga provoca un giro ipsilateral en ratas con lesión unilateral de la sustancia nigra. Se sabe que se trata de un efecto presináptico porque con un pretratamiento con metil-p-tirosina o reserpina desaparece el efecto. Algunos otros agentes como la amantidina, nomifensina y mazindol producen un giro ipsilateral a la lesión; b) drogas bloqueadoras de los receptores dopaminérgicos (neurolépticos) cuya administración sistémica provoca en este modelo una asimetría postural, algunas veces acompañada de conducta de giro contralateral a la lesión. Las drogas neurolépticas bloquean la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos. Entre ellas el haloperidol y el spiroperidol son capaces de bloquear el giro inducido por anfetamina y apomorfina; por último c) agonistas que actúan directamente sobre los receptores dopaminérgicos, entre ellos la apomorfina ha sido considerada como el agonista dopaminérgico clásico. En ratas con lesión provocada por la 6-OHDA la apomorfina induce el giro contralateral a la lesión (Ungerstedt, 1971). El giro es vigoroso, de tal modo que el

animal describe un círculo de diámetro pequeño. Se cree que la pérdida de las aferentes dopaminérgicas nigroestriatales provoca una hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos del estriado. La apomorfina parece actuar sobre estos receptores hipersensibles provocando un giro contralateral a la lesión, el cual es proporcional a la extensión de la denervación inducida por la 6-OHDA. Para producir la conducta de giro por la apomorfina, se requiere una reducción de la dopamina estriatal de un 90% (Hefti y cols, 1980). Algunas drogas derivadas del ergot, como la bromocriptina, ergocornina y LSD provocan un giro contralateral en este modelo. La bromocriptina induce el giro contralateral sólo después de un largo tiempo de latencia y el giro es reducido por bloqueadores de la recaptura de catecolaminas, lo que involucra algún componente presináptico. Así mismo, la L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) induce un giro contralateral en ratas con lesiones nigroestriatales provocadas por la 6-OHDA. Sin embargo, la L-DOPA no puede ser clasificada como un agonista dopaminérgico de acción directa, ya que debe ser convertida a dopamina para estimular a las células postsinápticas hipersensibles, por lo que el giro provocado es inhibido por drogas inhibitoras del enzima aminoácido-aromático descarboxilasa, pero potenciado si estos inhibidores actúan sólo sobre la descarboxilasa periférica. Este dato sugiere que la conversión es a nivel central, aunque el sitio exacto no se conoce, estando posiblemente involucrados los sistemas

que contienen 5-HT. En los pacientes con enfermedad de Parkinson, se piensa que la L-dopa es almacenada y convertida en dopamina por las células dopaminérgicas que sobreviven.

Si bien, la neurotoxina 6-OHDA provoca en ratas un modelo útil de parkinsonismo, el compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) provoca un síndrome cuyos síntomas lo hacen indistinguible de la enfermedad de Parkinson. Este síndrome fue reportado inicialmente en humanos debido a una autoadministración de este compuesto, vendido erróneamente como sustituto de la heroína (Langston y cols, 1983). Los estudios posteriores en monos mostraron que la inyección intraperitoneal o intravenosa del MPTP provoca una destrucción de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, así como la pérdida de la innervación dopaminérgica en el caudado putamen. En otras especies animales, como la rata y el gato, la respuesta al MPTP es reducida, por lo que los monos han sido utilizados como un buen modelo para el estudio de los efectos degenerativos del MPTP. El MPTP es rápidamente convertido en la amina cuaternaria 1-metil-4-fenilpiridina o MPP<sup>+</sup>, teniendo esta reacción como intermediario una dihidropiridina (MPDP<sup>+</sup>). El primer paso de la reacción, la conversión de MPTP a MPDP<sup>+</sup>, esta mediado por la monoaminoxidasa B (MAO B), por lo que sus inhibidores protegen del parkinsonismo y de la muerte de las células nigrales a los primates (Langston y cols, 1984). El MPP<sup>+</sup> es introducido a la terminal presináptica por el

sistema de recaptura de la dopamina, al parecer con la misma afinidad que ésta. Los bloqueadores de la recaptura de dopamina protegen a las terminales dopaminérgicas contra los efectos del MPTP en ratones (Ricaurte y cols, 1985). El MPP<sup>+</sup> es acumulado en las terminales dopaminérgicas y se piensa que actúa en éstas ya sea por la generación de peróxido de hidrógeno y radicales libres, o al interferir con la respiración mitocondrial (Revisado por Zigmond y Stricker, 1989).

Con la ayuda de estos modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson se han tratado de desarrollar nuevas terapias, buscando lograr la recuperación total de los pacientes. Aún cuando la terapia con L-dopa ha proporciónado un avance significativo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, sólo controla algunos de los síntomas, y no altera el curso temporal de la enfermedad. Además, muchos pacientes se vuelven refractarios o sufren efectos colaterales después del tratamiento prolongado con L-dopa. Tras varios años de experimentación con el modelo animal de la enfermedad, a principios de la década de 1980 surge una alternativa para los pacientes: el transplante de tejido cerebral.

#### **Transplantes en la enfermedad de Parkinson**

Desde fines del siglo XIX y principios del XX, los neurocientíficos tuvieron en mente el concepto de plasticidad del sistema nervioso, así como la posibilidad de modificación

de las neuronas tanto en forma como en conectividad. Si bien, las investigaciones tradicionales se remontan a Thompson (1890), Forssman (1898, 1900) y Saltykow (1905), estos estudios fueron hechos con diferentes preguntas en mente.

A principios de la década de 1970, tres diferentes laboratorios: Das y Altman en 1971-1972; Olson y Malmfors en 1970; Olson y Seiger en 1972 y Björklund y colaboradores en 1971 (revisado por Björklund y Stenevi, 1985) introdujeron nuevas técnicas de autorradiografía e histoquímica iniciando así una nueva etapa en la historia del estudio del trasplante de tejido nervioso.

Los trasplantes de tejidos u órganos suelen llamarse injertos. La técnica de trasplante ha sido ampliamente estudiada en animales de laboratorio, por lo que ha sido necesario establecer una nomenclatura en relación al trasplante. Respecto a la variabilidad génica, un injerto hecho de una parte de un individuo a otra del mismo individuo se llama trasplante autólogo o autoinjerto. Un injerto realizado de un animal de una cepa endogámica a otro que pertenece a la misma cepa se llama isoinjerto o trasplante singénico. Un injerto de un miembro de una especie dada a otro miembro de la misma especie (pero no miembros de la misma cepa endogámica) se llama homoinjerto o alotrasplante. Un injerto efectuado entre miembros de distintas especies se llama heteroinjerto o xenotrasplante. De acuerdo al sitio de

transplante los trasplantes son homotópicos cuando son colocados en igual posición en el hospedero con respecto al donador, o heterotópicos cuando la posición en el hospedero es distinta a la que ocupaba en el donador.

La idea de que los déficits asociados a las lesiones de sustancia nigra pueden ser aliviados por el trasplante de ciertos tejidos es muy atractiva, no sólo por su aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, sino también porque brinda un modelo en el que se pueden alterar las funciones del cerebro por medio de un trasplante (Freed y cols, 1990). La mayoría de la literatura acerca de trasplantes de tejido nervioso, tanto a nivel clínico como básico, se relaciona con la enfermedad de Parkinson (Freed, 1993). En la literatura básica actual se manejan principalmente dos procedimientos: el trasplante de médula adrenal y el trasplante de mesencéfalo o sustancia nigra fetal. Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas, que incluyen el uso de células tumorales encapsuladas, líneas celulares manipuladas por ingeniería genética y células dopaminérgicas obtenidas del ganglio cervical superior.

Perlow y colaboradores (1979) reportaron por primera vez que el trasplante en bloque de células dopaminérgicas del mesencéfalo ventral fetal colocado en el ventrículo lateral, es capaz de revertir la conducta de giro producida por apomorfina en ratas con lesión nigroestriatal provocada por la

6-OHDA. En ese mismo año, Björklund y Stenevi (1979) proponen la reconstrucción de la vía nigroestriatal por medio del trasplante intracerebral de células fetales dopaminérgicas de las regiones A9 y A10, colocado en una cavidad artificial realizada en la corteza parietal anterior y en el cuerpo calloso ipsilateral a la lesión por la 6-OHDA. Cuando los animales transplantados son evaluados con inyección intraperitoneal (IP) de apomorfina se observa un decremento en la conducta de giro con respecto a la conducta antes del trasplante. En ambos trabajos, el análisis con histofluorescencia pone de manifiesto la sobrevivencia y crecimiento del trasplante, y se observa además una mejoría conductual cuando los animales transplantados recibieron apomorfina IP (en el primer caso) o anfetamina.

Trabajos posteriores (Dunnet y cols, 1981; Freed y cols, 1983b) indican una mejoría conductual en todos los casos en que los animales han recibido trasplante intraventricular o intraparenquimal de sustancia nigra fetal. Freed y colaboradores (1983a) asocian las mejorías conductuales producidas por el trasplante con una disminución a nivel postsináptico estriatal de la hipersensibilidad de los receptores a dopamina, la cual es aportada por el tejido dopaminérgico fetal que reinerva al estriado.

Se ha demostrado que el déficit motor provocado por la lesión nigroestriatal con 6-OHDA es revertido por el

transplante de tejido cerebral de feto con alto contenido de dopamina, por lo que existe especificidad del tejido mesencefálico ventral y no así de otras áreas como corteza frontal, tectum (Freed y cols, 1983a), rafe (rico en serotonina) o el tejido estriatal (Dunnett y cols, 1988).

Los análisis de las células del mesencéfalo ventral de fetos humanos y de rata, mantenidos en cultivo, muestran que alrededor del 0.1 al 0.5% de estas células son inmunoreactivas a Tirosina Hidroxilasa (TH) en humano, y entre 0.1 a 1% en rata, teniendo habilidad para sintetizar y almacenar dopamina, lo que se pone de manifiesto cuando se analizan extractos de estos cultivos por HPLC (Walters y cols, 1992). En este mismo estudio se observa que tanto las células fetales humanas como las de rata, en cultivo, tienen la capacidad de producir recuperación de la conducta en el modelo de enfermedad de Parkinson producido con 6-OHDA en ratas. Wictorin y colaboradores (1992), proponen que la capacidad de los neuroblastos para emitir axones a través de la vía nigroestriatal lesionada, cuando éstos son colocados homotópicamente, se debe a que escapan o "neutralizan" la naturaleza no permisiva del tejido nervioso, que actúa inhibiendo el alargamiento de axones regenerados a lo largo de los tractos de fibras mielinizadas, inhibición mediada por proteínas de membrana presentes en los oligodendrocitos y en la mielina del sistema nervioso central (Schwab, 1990).



El uso de tejido embrionario es una opción lógica, ya que existe consenso acerca de sus efectos funcionales y reinervación en el cerebro receptor; sin embargo las limitaciones para el uso de este tejido incluyen problemas éticos y prácticos, relacionados con la procedencia del tejido fetal y con la barrera inmunológica. Por su parte, aún cuando los efectos funcionales de los trasplantes de médula adrenal son menores a los producidos por los del sistema nervioso fetal, los problemas del donador de tejido y del rechazo son eliminados.

Las células cromafines de la médula adrenal tienen la capacidad de sintetizar y almacenar catecolaminas. Aún cuando provengan de animales maduros, pueden mostrar una transformación morfológica, que incluye el desarrollo de procesos, cuando son aisladas de la glándula adrenal y mantenidas en cultivo o transplantadas, siendo capaces de inervar al tejido nervioso cotransplantado en la cámara anterior del ojo (Olson y cols, 1980). La transformación es normalmente inhibida por concentraciones altas de corticoesteroides de la corteza adrenal, por lo que ésta sólo ocurre cuando las células crecen en aislamiento. La adición del factor de crecimiento nervioso (NGF) promueve la formación de procesos (Unsicker y cols, 1978).

La idea inicial de que la médula adrenal podría ser transplantada en animales con el modelo de la enfermedad de

Parkinson, se basó en la capacidad de las células cromafines para producir y secretar cantidades sustanciales de catecolaminas. En los trabajos pioneros de Freed y colaboradores (1981) se transplantó médula adrenal de donadores jóvenes en el ventrículo lateral de animales con lesión nigroestriatal por 6-OHDA, observando una disminución significativa de la conducta de giro inducida por apomorfina, lo cual se correlaciona con el hallazgo de un número consistente de células sobrevivientes.

En 1982, el grupo sueco de Backlund y Olson, transplantó médula adrenal en el estriado de pacientes dos humanos, basándose en que los trasplantes realizados en ratas con el modelo de 6-OHDA, disminuyen, con éxito la conducta de giro, y logran sobrevivir en el estriado. Sin embargo, el reporte final publicado tres años después (Backlund y cols, 1985) concluye que no se observaron mejorías en los pacientes transplantados. Posteriormente, Madrazo, Drucker-Colín y colaboradores (1987), reportaron el trasplante exitoso de médula adrenal en el ventrículo lateral adyacente al núcleo caudado de dos pacientes, y observaron una mejoría inmediata en un seguimiento de hasta diez meses. Estos intentos iniciales han sido seguidos por una serie de grupos, quienes han recurrido no sólo al trasplante de médula adrenal (Drucker-Colín y cols, 1988; Goetz y cols, 1989; Jiao y cols, 1989), sino también al de mesencéfalo ventral fetal (Madrazo y cols, 1988; Spencer y cols, 1992, Widner y cols, 1992) en

busca de una mejoría para los pacientes.

Las células cromafines en los trasplantes de médula adrenal pueden ser identificadas por su inmunoreactividad para cromogranina A, tirosina hidroxilasa (TH) y dopamina β-hidroxilasa (DBH). La inmunoreactividad para PNMT se encuentra disminuida (Freed y cols, 1990).

En estudios bioquímicos (Freed y cols, 1983a) se ha observado que los trasplantes intraventriculares de médula adrenal en ratas, contienen cantidades sustanciales de dopamina, que superan las cantidades encontradas en la sustancia nigra normal y en el núcleo caudado intacto, lo que apoya la idea de que la dopamina observada en el trasplante es producida por él mismo y no por el cerebro hospedero (Freed y cols, 1990). Las cantidades de dopamina son además muy similares a las que contienen los trasplantes de sustancia nigra (Freed y cols, 1983a). En otros estudios (Becker y Freed, 1988; Date y cols, 1990) se ha observado que las concentraciones de dopamina en el estriado adyacente al trasplante intraventricular o estriatal de médula adrenal se incrementan.

Los trasplantes de médula adrenal de rata tomada de donadores viejos (22 a 24 meses de edad) son inefectivos para disminuir la conducta de giro en animales con lesión nigroestriatal. Sin embargo Hansen y colaboradores (1988) han

encontrado que las células cromafines humanas de donadores de 3 a 51 años de edad muestran formación de procesos en presencia de NGF *in vitro*. Herrera-Marschitz y colaboradores (1984) y Strömberg y colaboradores (1984) encontraron que, cuando se transplanta en el estriado denervado de rata médula adrenal de donadores adultos, ésta secreta casi inmediatamente catecolaminas al estriado hospedero, provocando una conducta de giro contralateral de corta duración. Sin embargo, en estudios a largo plazo, se ha observado que la sobrevivida de las células cromafines transplantadas intraparenquimalmente es muy baja en comparación con el trasplante intraventricular (Freed y cols, 1986). Las células cromafines disociadas también sobreviven muy poco en el estriado, aunque Bing y colaboradores (1988), han encontrado reducciones sustanciales en la conducta de giro correlacionadas con no más de 100 células vivas. La sobrevivida de células cromafines de médula adrenal transplantada en bloque, es aumentada por la infusión crónica de NGF en el sitio del trasplante, observándose además la formación de pequeños procesos (Strömberg y cols, 1985).

Las células cromafines provenientes de médula adrenal de animales neonatos poseen una gran capacidad de transformación morfológica, que incluye la formación de procesos, cuando son transplantadas en el cerebro (Nishino y cols, 1988).

En algunos experimentos donde se han obtenido efectos conductuales, aún cuando la sobrevida es muy baja, se ha concluido que el trasplante debe estar actuando por otros mecanismos. En general se ha observado que los efectos conductuales de los trasplantes de médula adrenal son mayores cuando éstos se colocan en el ventrículo y que el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) aumenta la sobrevida de los trasplantes intraparenquimales así como sus efectos conductuales.

Los mecanismos de acción de los trasplantes de médula adrenal son complejos, estando involucrados una serie de procesos y no sólo la simple secreción de catecolaminas. Una posibilidad es que el rompimiento de la barrera hematoencefálica después del trasplante de la médula adrenal esté relacionado con los efectos conductuales. Esta hipótesis está basada en estudios que muestran una correlación entre los efectos conductuales de los trasplantes de médula adrenal y las concentraciones sanguíneas de catecolaminas; los animales con las concentraciones más altas de dopamina en sangre mostraron un mayor decremento en la conducta de giro (Becker y Freed, 1988). Rosestein (1987) demostró que el trasplante de médula adrenal en el cuarto ventrículo, en la corteza cerebral o en el hipocampo, provoca un rompimiento de la barrera hematoencefálica que se pone de manifiesto por la capacidad de las células cromafines transplantadas de recapturar [ $^3\text{H}$ ]-Dopamina inyectada en la circulación sanguínea. Esta capacidad

es menor en las células de los trasplantes intraparenquimales que en los intraventriculares.

### **Efectos tróficos**

En el modelo animal de enfermedad de Parkinson con MPTP, los trasplantes intraparenquimales de médula adrenal pueden promover el alargamiento y la expresión de TH de las neuritas que los rodean. Bohn y colaboradores (1987) reportaron que los trasplantes de médula adrenal potencian la recuperación de las fibras dopaminérgicas estriatales en ratones jóvenes tratados con MPTP, aún cuando las células del trasplante muestren poca sobrevivencia, lo que sugiere que el mejoramiento de los síntomas motores puede deberse a la regeneración y formación de neuritas del hospedero. Se ha propuesto que esta regeneración y formación de neuritas se deba a la secreción de factores tróficos por las células de la médula adrenal o por las células de Schwann en el trasplante, la glía alrededor de éste, o los macrófagos (Date y cols, 1990). En este mismo trabajo se sugiere que los ratones viejos tienen una menor respuesta a los factores tróficos, explicando de este modo su menor capacidad regenerativa. En humanos, el fenómeno de formación de neuritas y la potenciación de la expresión de TH por el trasplante de médula adrenal ha sido observado en exámenes postmortem (Kordower y cols, 1991), por lo que una de las posibles acciones del trasplante de médula adrenal sea la inducción de la formación de neuritas dopaminérgicas.

El trasplante de médula adrenal en bloque acompañado de la infusión crónica de factor de crecimiento nervioso (NGF) reduce de manera significativa la conducta de giro inducida por apomorfina, siendo al parecer más efectivo este método comparado con el simple trasplante de médula adrenal (Olson y cols, 1985). Se ha observado que la inyección de NGF durante el trasplante de tejido no cromaffn, reduce el parkinsonismo experimental en ratas viejas (Pezzoli y cols, 1988).

La posibilidad de proteger y regenerar por medio de factores tróficos vías neuronales dañadas, y de promover la sobrevivencia de las células transplantadas, ha llevado a un estudio más profundo de los mecanismos por medio de los cuales actúan los factores tróficos. Hasta hace algunos años se definía a los factores neurotróficos como polipéptidos biológicamente activos que desarrollan funciones relacionadas con el control de la diferenciación celular. Así mismo se pensaba que eran secretados por un solo tipo celular para transmitir una señal particular a un segundo tipo celular. Actualmente se sabe que las interacciones de los factores neurotróficos son menos específicas y mucho más complejas de lo que se pensaba.

El NGF, descubierto a principios de la década de 1950, representa la primera realización molecular del concepto de factor neurotrófico. En 1951 Levi-Montalcini y Hamburger observaron que un factor difusible (NGF) secretado por el

sarcoma 180 de ratón, implantado en embriones de pollo, producía el crecimiento de neuritas de los ganglios simpáticos y sensoriales. Cohen en 1960 purificó el NGF de la glándula submaxilar de ratón y demostró que este factor era una proteína. Trabajos posteriores determinaron que se trataba de un complejo de tres subunidades, de las cuales sólo una tenía efectos en las neuronas. La subunidad activa  $\beta$  tiene un peso molecular de aproximadamente 26 000 Daltones y se compone de dos cadenas idénticas de 118 aminoácidos unidas por enlaces no covalentes (Revisión en Greene y Shooter, 1980; Levi-Montalcini, 1987).

A través de más de cuarenta años de experimentación se ha observado que los efectos del NGF sobre las células nerviosas son variados incluyendo la inducción de enzimas de síntesis de neurotransmisores, el incremento de la síntesis de neuropéptidos en las neuronas sensoriales, la potenciación de la sobrevivida; estimula la formación, ramificación y alargamiento de neuritas, la síntesis de neurofilamentos y actúa como atrayente quimiotáctico en los conos de crecimiento de las neuronas sensoriales; además previene la muerte neuronal por daño mecánico o químico (Korsching, 1993). Al parecer, todas las neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural requieren NGF para sobrevivir durante el desarrollo embrionario y el período post-natal temprano. En edad adulta los factores tróficos actúan crónicamente para mantener las funciones neuronales normales (Snider y cols, 1989).



El mecanismo clásico mediante el cual actúan los factores neurotróficos es como mensajeros retrógrados. Este comprende, la síntesis del factor neurotrófico en las células blanco de una neurona, la secreción como una forma soluble en el espacio extracelular, la recaptura mediada por un receptor y el transporte axonal retrógrado hacia el soma de la neurona. Sin embargo, muchos tipos neuronales dependen de sus aferentes para su supervivencia, lo que implica la existencia de señales tróficas anterógradas (Korsching, 1993).

Existen dos tipos de receptores para la familia de las neurotrofinas, familia a la cual pertenece el NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas 3, 4 y 5). El primer tipo es el receptor de baja afinidad a NGF, también conocido como receptor de baja afinidad a neurotrofinas (LANR). El segundo tipo es la familia de receptores trk (tirosina cinasa). Se ha sugerido que la transducción de la señal se lleva a cabo sólo por la familia de receptores trk, y al parecer el LANR participa en el transporte axonal retrógrado.

El NGF parece tener un efecto modesto en la síntesis de tubulina, sin embargo incrementa de manera significativa la síntesis de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) incluyendo la tau y MAP5, que prevalecen durante el desarrollo del sistema nervioso central. El NGF también promueve la fosforilación de estas proteínas, lo que aumenta sus

interacciones con los microtúbulos. Como resultado, los niveles de tubulina libre decrecen lo cual puede a su vez estimular la síntesis de tubulina.

Por medio de hibridización diferencial de células PC12, estimuladas con NGF y no estimuladas, se ha podido identificar la inducción de genes de proteínas de unión nuclear, proteínas que unen  $Ca^{2+}$  y una proteína de filamentos intermedios (Snider y Johnson, 1989).

Las neuronas simpáticas y las células cromafines de la médula adrenal se originan de la cresta neural. Ambos tipos celulares sintetizan las enzimas necesarias para la formación de adrenalina. Las neuronas simpáticas liberan la adrenalina en las cercanías del órgano efector por un mecanismo especializado en sus terminales nerviosas; en contraste, las células cromafines carecen de procesos especializados y liberan la adrenalina en la circulación general, ya que se trata de células endócrinas.

En las neuronas simpáticas, el NGF en el soma celular induce la síntesis de tirosina hidroxilasa (Paravicini y cols, 1975). Observaciones posteriores demostraron que la médula adrenal produce y secreta NGF en cultivo (Harper y cols, 1976). En 1978, Unsicker y colaboradores observaron que el NGF produce el crecimiento de fibras en las células cromafines aisladas. Este crecimiento desaparece con concentraciones de

glucocorticoides equivalentes a las circulantes en sangre en la glándula adrenal.

El hecho de que las concentraciones fisiológicas de glucocorticoides impidan el crecimiento de neuritas mediado por NGF *in vitro* sugiere, una relación causal entre la concentración de glucocorticoides en la médula adrenal *in vivo* y la ausencia de neurogenización. En las células cromafines aisladas también se ha observado el incremento en la actividad de la tirosina hidroxilasa y no así de la PNMT (Seidl y cols, 1987).

En la línea celular de feocromocitoma PC12 (células cromafines neoplásicas), también derivada de la cresta neural, el NGF promueve la diferenciación hacia un fenotipo de neuronas simpáticas (Greene y Tischler, 1976). Varios días después de la exposición de las células PC12 al NGF se llevan a cabo fenómenos mediados por transcripción, incluyendo la extensión de neuritas, el cese de la mitosis y la adquisición de un fenotipo neuronal caracterizado por el desarrollo de excitabilidad eléctrica y biosíntesis de neurotransmisores. Para iniciar este programa de diferenciación el NGF interactúa con dos receptores identificados, el gp140<sup>trk</sup> y el p75<sup>NGFR</sup> (Johnson y cols, 1986). La actividad de cinasa de tirosinas del receptor gp140<sup>trk</sup> es inducida después de la unión del NGF en las células PC12. Se piensa que la cinasa de tirosinas trk, activada por ligando, inicia una cascada de señales que

incluye la fosforilación de tirosinas de varias proteínas celulares como la fosfolipasa C- $\gamma$ 1 y la fosfatidil inositol-3 cinasa. Otros fenómenos inducidos por el NGF son la activación de numerosas proteínas cinasas, incluyendo serina/treonina cinasas como las cinasa MAP, la cinasa S6 y la proteína cinasa C, así como la activación de genes, como el c-fos, NGFIA y el NGFIB. En las células PC12 el crecimiento de neuritas es iniciado después de 24 a 48 horas de exposición al NGF, y la adquisición del fenotipo neuronal ocurre después de 3 a 4 días (Greene and Tischler, 1976).

Recientemente se ha observado que otro tipo de estímulo distinto al de los factores tróficos, es capaz de inducir una diferenciación de las células cromafines en cultivo, para que adquirieran un fenotipo neuronal. Se trata de la estimulación magnética que, lejos de ser un estímulo químico es un estímulo físico (Drucker-Colín y cols, 1994).

### **Campos magnéticos**

La estimulación con pulsos de alta amplitud de campos magnéticos generados por bobinas externas al cuerpo, ha sido usada para diagnóstico médico desde mediados de la década de 1980, estimulando las neuronas motoras y los nervios periféricos. Este tipo de estimulación ofrece una serie de ventajas, ya que es un procedimiento no invasivo, sin contacto directo, el cual produce una incomodidad mínima al paciente pues sólo fluye baja densidad de corriente a través de los

receptores a dolor durante la estimulación (Barker y cols, 1985). La estimulación magnética del cerebro, de la médula espinal y de los nervios periféricos ha sido empleada para diagnosticar varias condiciones clínicas asociadas con la conducción anormal de las vías motoras (Stuchly y Esselle, 1992). También se han observado los efectos terapéuticos de los campos magnéticos en la reparación de tejidos conectivos.

Un estimulador magnético típico consiste en un capacitor  $C$  el cual es cargado con un voltaje  $V$  y luego descargado a través de una bobina estimuladora de inductancia  $L$  y una resistencia  $R$ . La derivada espacial del campo eléctrico inducido magnéticamente es la responsable de la estimulación. El cálculo del campo eléctrico inducido por el campo magnético y sus derivados espaciales en los tejidos biológicos resulta ser muy complejo pues necesita de métodos numéricos que requieren un tiempo de computación considerable.

La estimulación magnética es una nueva técnica para activar las neuronas en la corteza. La estimulación ocurre cuando se hace pasar un pequeño pulso de corriente a través de una bobina cercana a la cabeza, que produce un campo magnético en el cerebro por inducción electromagnética. Esta técnica ha sido usada para mapear la corteza motora y para estudios de la conducción motora central. Las posibles aplicaciones clínicas de la estimulación magnética incluyen el diagnóstico de esclerosis múltiple, esclerosis lateral

amiotrófica y otros trastornos atáxicos degenerativos, y el monitoreo del tracto corticoespinal durante la cirugía de la médula espinal. La técnica es no invasiva y es menos dolorosa que la estimulación eléctrica del cerebro a través de electrodos de superficie (Roth y cols, 1991).

Los efectos terapéuticos de los campos magnéticos están ampliamente relacionados con la reparación del tejido. La arquitectura molecular de la matriz extracelular es crítica para el buen funcionamiento de los tejidos conectivos, y su reparación requiere de la síntesis y organización de una matriz extracelular apropiada para el funcionamiento del tejido en su ambiente biofísico (Aaron y Ciombor, 1993). Se ha observado que tanto las señales mecánicas como las eléctricas regulan la síntesis de la matriz extracelular, al parecer mediante la estimulación de vías de señalización en la membrana celular dando como resultado la aparición de segundos mensajeros, particularmente de nucleótidos cíclicos. La aplicación terapéutica de los campos electromagnéticos más ampliamente explotada ha sido la reparación del hueso. Los estudios *in vitro* muestran que osteoblastos en cultivo incrementan su proliferación, medida por incorporación de timidina, y presentan cambios en las concentraciones del AMPc. En el caso del cartilago, algunos datos indican que los campos eléctricos parecen tener un efecto regulatorio en los condrocitos para incrementar selectivamente la síntesis de proteoglicanos, pero no así la producción de colagena. El

estudio de la reparación de tejidos suaves se ha enfocado principalmente a los fibroblastos. Se ha reportado que ciertos campos magnéticos incrementan la síntesis de proteínas y DNA en fibroblastos de piel humana. La estimulación de los fibroblastos por el campo eléctrico incluye la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje y un incremento secundario de receptores a insulina (Bourguignon y Bourguignon, 1989).

Los efectos de los campos electromagnéticos en células cultivadas han sido estudiados por muchos investigadores empleando una variedad de sistemas de exposición *in vitro*. Los estudios recientes han mostrado que el campo eléctrico inducido por un sistema de exposición magnética, contribuye de manera importante a la síntesis de RNA (Greene y cols, 1991).

Un campo magnético de baja frecuencia pasa sin sufrir atenuación a través de un medio biológico conductor, como es el caso de una suspensión celular o una monocapa de células cultivadas en un medio de cultivo líquido. Es importante tener en mente que un campo magnético, distribuido uniformemente en un volumen ocupado por una muestra de medio líquido, induce un campo eléctrico dentro del medio que es altamente desigual.

## OBJETIVO

Observaciones previas en nuestro laboratorio indicaron que las células cromafines de rata mantenidas en cultivo y estimuladas por campos magnéticos de baja frecuencia (7 Gauss), tienen la capacidad de adoptar un fenotipo neuronal. Cuando las células recibieron 12 horas de estimulación (1 pulso diario de 2 horas durante 6 días) se observó un grado menor de cambio fenotípico, comparado con el provocado por la estimulación durante 24 horas (2 pulsos diarios de dos horas cada uno durante 6 días). Asimismo, cuando las células fueron estimuladas 144 horas (estimulación continua durante 6 días), el grado de diferenciación se vió disminuido. Por otro lado, se realizaron ensayos bioquímicos en los que se cuantificó la liberación de Noradrenalina tritiada ( $[^3\text{H}]\text{-NA}$ ) inducida por despolarización con KCl en células cromafines no diferenciadas y en las diferenciadas por NGF o campos magnéticos. En estas pruebas no se encontró ninguna diferencia aparente en la capacidad de liberación de NA de las células en las tres condiciones.

Con base en estos datos, se planteó como objetivo de este trabajo observar si existen diferencias funcionales de las células cromafines no diferenciadas y diferenciadas en presencia de NGF o de campos magnéticos de baja frecuencia (7 Gauss), expresadas en términos de su capacidad de reducir la conducta de giro del modelo animal de la enfermedad de Parkinson.



## METODOS

### Cultivo

Se obtuvieron glándulas suprarrenales de ratas Wistar de sexo indistinto, neonatas (1 a 3 días de edad), de las cuales se separó la médula por disección microscópica. El tejido fue lavado en solución salina Spinner libre de calcio y magnesio (SSS, Sigma) suplementada con 1 mg/ml de albúmina. La disociación enzimática se llevó a cabo en una solución de SSS con 2 mg/ml de colagenasa (tipo I, Worthington) y 15  $\mu$ g/ml de desoxirribonucleasa I (tipo II, Sigma), durante 40 minutos en un baño de agitación constante a 37°C. Se realizaron posteriormente tres lavados con medio SSS y desoxirribonucleasa y en el último lavado se efectuó una disociación mecánica con pipetas de diámetros graduados hasta obtener una suspensión celular homogénea, la cual se centrifugó a 850 rpm durante 10 minutos. El botón obtenido fue resuspendido en 10 ml de medio DMEM(Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, insulina (4.5  $\mu$ g/ml), 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y 2.5  $\mu$ g/ml de fungizona y se realizó una segunda centrifugación. El botón fue resuspendido nuevamente en DMEM.

El número aproximado de células vivas obtenido en cada cultivo fue determinado por el método de exclusión celular con azul de tripano. La suspensión celular fue diluida con DMEM suplementado y sembrada a una densidad de 250 000 células por

pozo. Los cultivos se mantuvieron por 7 días en un ambiente húmedo con una mezcla gaseosa de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C.

### Tratamientos

Los cultivos celulares fueron sometidos a diferentes condiciones experimentales:

**NGF:** las células fueron expuestas a 100 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (NGF) durante 7 días.

**Campos magnéticos:** el cultivo celular recibió cuatro horas diarias de estimulación por campos magnéticos (7 Gauss), durante 7 días.

**Control:** las células fueron mantenidas en cultivo durante 7 días.

### Tripsinización

Transcurridos siete días, las células fueron despegadas del plato de cultivo utilizando el método de tripsina. Se realizó una incubación durante diez minutos a 37°C con 1 ml/pozo de buffer fosfato 0.9% NaCl (PBS) 0.01 M sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>; 1 mM de EDTA (PBS sin Ca/Mg). Posteriormente se incubó con 400 µl de tripsina al 0.01% en PBS sin Ca/Mg, el tiempo necesario para provocar el desprendimiento de las células. La reacción fué detenida al agregar 1 ml/pozo de medio suplementado y las células fueron recuperadas con una pipeta Pasteur siliconizada y con punta redondeada; los pozos fueron

lavados con 400  $\mu$ l de medio y de este modo se obtuvo un volumen final de 1.8 ml, el cual fue centrifugado a 20°C y 810 rpm.

### Inmunocitoquímica

A fin de observar de manera cualitativa la sobrevida y funcionalidad de las células en cultivo, se realizaron pruebas de inmunotinción para las diferentes condiciones experimentales por el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa.

Las células mantenidas en cultivo durante siete días fueron fijadas con 1 ml por pozo de paraformaldehído al 4% en PBS 0.01 M pH 7.4, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con 750  $\mu$ l de PBS 0.01 M pH 7.4 a temperatura ambiente.

Se realizó una permeabilización con 750  $\mu$ l PBSGT (PBS 0.01 M pH 7.4 con suero normal de cabra al 1% y Triton X100 al 0.1%) durante 20 minutos. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas con 200  $\mu$ l/pozo de anticuerpo primario (Anti Tirosina-hidroxilasa, Chemicon) en una dilución 1:1 000 en PBSGT.

Las células fueron incubadas en el anticuerpo secundario (IgG biotinilado contra conejo en dilución 1:200 en PBSGT),

durante dos horas con agitación constante. Simultáneamente se preparó el conjugado avidina-biotina (50  $\mu$ l de avidina, 50  $\mu$ l de biotina en 5 ml de PBSGT). Transcurrida la incubación con anticuerpo secundario, se realizó una última incubación, durante dos horas con complejo avidina-biotina.

Para el revelado se empleó 3,3' diaminobencidina como cromógeno en solución con TBS (buffer Trizma 0.9% NaCl) 0.1 M pH 7.4, 1 ml por pozo en oscuridad con 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hsu y cols., 1981).

### Lesión

Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso de 180 a 200 gr, con libre acceso al alimento y agua, y con un ciclo luz-oscuridad 12/12.

Los animales fueron anestesiados con halotano (0.8% en una mezcla 95/5% O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). La lesión unilateral de la vía nigroestriatal fue hecha por inyección estereotáxica de 6-OHDA (4  $\mu$ l de una solución 2  $\mu$ g/ $\mu$ l en 0.9% NaCl con 0.5% de ácido ascórbico), en el haz de fibras del cerebro medio anterior (coordenadas: 2.9 mm AP a Bregma, 1.5 mm lateral a la sutura sagital y 8.8 mm debajo de la superficie del cráneo; la barra de incisivos fué colocada a 2.4 mm abajo de la línea interaural (Paxinos y Watson, 1986)). El flujo de inyección fue de 0.5  $\mu$ l/minuto, dejando la cánula 1 minuto adicional con

el fin de que la solución difundiera a través del tracto de ésta.

Para evaluar el grado de denervación estriatal, se les administró a los animales una inyección IP de apomorfina (0.25 mg/kg) transcurridos diez días post-lesión, y se cuantificó el número de giros contralaterales provocados por ésta. Fueron seleccionados para este estudio sólo los animales que completaron más de 200 giros completos contralaterales a la lesión en 30 minutos. Estos animales fueron evaluados de la misma forma dos veces más (una cada diez días).

### Transplante

Los animales que cumplieron los criterios de evaluación previamente mencionados fueron asignados aleatoriamente a los siguientes grupos experimentales:

Animales que recibieron:

- a) NGF: transplante de células cromafines cultivadas durante siete días en presencia del NGF (n=6).
  
- b) CAMPOS MAGNETICOS: transplante de células cromafines cultivadas que recibieron estimulación por campos magnéticos de baja frecuencia (7 Gauss), dos pulsos diarios de 2 horas cada uno durante siete días (n=6).

c) CONTROL: trasplante de células cromafines cultivadas durante siete días sin ningún tratamiento (n=6).

d) TESTIGO: inyección de vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial), n=6.

Las ratas fueron anestesiadas con halotano (0.8% en mezcla 95/5% O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) y la inyección estereotáxica se realizó con una microjeringa de 5 $\mu$ l en las coordenadas correspondientes al estriado ipsilateral a la lesión (Björklund y Stenevi, 1979).

Las células provenientes de la tripsinización fueron centrifugadas a 800 rpm y se les retiró el medio de cultivo. El botón fué resuspendido en 8  $\mu$ l de líquido cefalorraquídeo artificial. La jeringa fue cargada con esta suspensión y se realizaron dos inyecciones de 4  $\mu$ l cada una en las siguientes coordenadas: 1) AP 1 mm, L -1.5 mm, V -5.5mm 2) AP -0.5 mm, L -3.5 mm, V -5.5 mm (Paxinos y Watson, 1986).

El flujo de inyección fué de 1  $\mu$ l/minuto y la cánula permaneció en el sitio dos minutos adicionales con el fin de permitir la difusión de la suspensión celular antes de retirar la jeringa.

Finalmente los animales recibieron una inyección intramuscular de penicilina benzatinica (200 000 IU).

## Evaluación

A los quince días post-transplante los animales recibieron una inyección IP de apomorfina (0.25 mg/Kg). El número de giros contralaterales al sitio de la lesión fueron registrados por medio de un girómetro durante media hora. Evaluaciones posteriores quincenales fueron realizadas durante 135 días.

## Histología

Los animales fueron perfundidos intracardialmente con 250 ml de Buffer fosfato 0.9% NaCl (PBS) 0.1 M pH 7.2, seguido de 250 ml de fijador Somogy (paraformaldehído al 4%, ácido pícrico al 1.5% en PBS 0.1 M pH 7.2). El cerebro fue removido y criopreservado en soluciones de PBS/sacarosa a concentraciones crecientes (10%, 20% y 30%).

Posteriormente se realizaron cortes coronales por congelación en un criostato manual. El grosor de los cortes fué de 40  $\mu$ m, correspondiendo a las regiones del estriado y de la sustancia nigra. Los cortes fueron procesados para inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa por el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa anteriormente descrito, con algunas modificaciones. Por último fueron montados en portaobjetos, deshidratados con alcoholes graduales y cubiertos con Permount.

## RESULTADOS

### Cultivo

Las células cromafines cultivadas bajo condiciones control mostraron después de siete días un aspecto saludable, (forma redonda y apariencia granular), observándose agregados celulares células individuales.

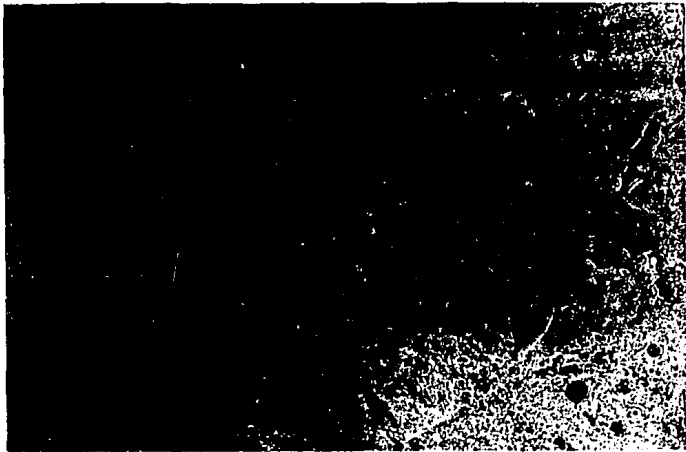
Las células estimuladas con NGF, así como las estimuladas por campos magnéticos (7 Gauss), adquirieron un fenotipo neuronal, con emisión de fibras de aspecto neurítico y soma de forma triangular. La longitud de las neuritas fué aparentemente mayor en los cultivos diferenciados con campos magnéticos que en los diferenciados con NGF, aunque no se realizaron mediciones (Fig. 6).

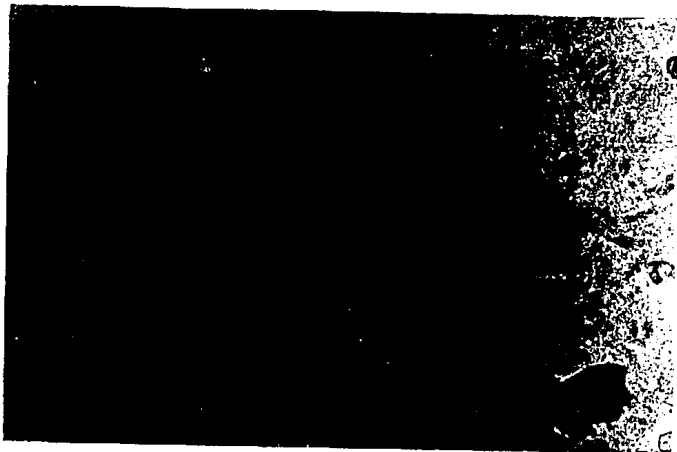
### Conducta

El número de giros basal de cada animal (promedio de las tres evaluaciones pre-transplante) fue promediado para obtener el número basal de giros total ( $300 \pm 11$ ) a partir del cual se obtuvieron los porcentajes de cambio en cada evaluación.

A los treinta días post-transplante los grupos que recibieron transplante de células cultivadas mostraron una reducción significativa ( $p < 0.01$ ) del número de giros en





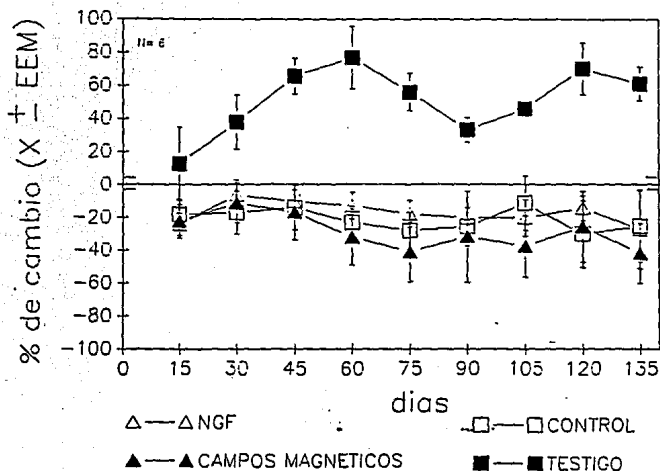


**Figura 6.-** Micrografías de células cromafines en cultivo. Las células mantenidas en condiciones control muestran una forma redondeada y aspecto granular (A). Las células estimuladas con NGF (100 ng/ml) adoptan un fenotipo neuronal emitiendo prolongaciones citoplasmáticas con aspecto neurítico (B). Las células estimuladas con campos magnéticos emiten el mismo tipo de prolongaciones (C).

comparación con aquellos animales que recibieron inyección intraestriatal del vehículo (Fig. 7). Las evaluaciones quincenales realizadas durante 135 días muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en la disminución de la conducta de giro cuando los animales recibieron trasplante de células cromafines control, estimuladas con NGF o con campos magnéticos; sin embargo se observa una ligera tendencia de las células diferenciadas por campos magnéticos a disminuir la conducta en comparación con las células control o las estimuladas con NGF.

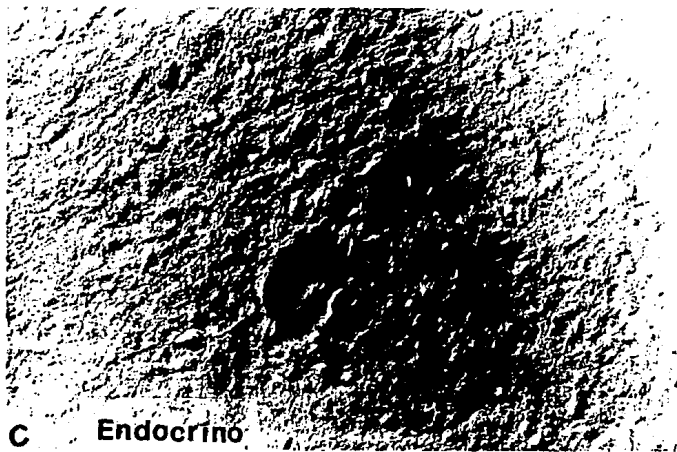
### **Trasplante**

La reacción inmunológica contra TH fué positiva en todos aquellos animales que recibieron trasplante. Las células cromafines transplantadas aparecen en el parénquima estriatal a los largo del trayecto de la cánula. Muestran un aspecto saludable, y en algunos casos tienen prolongaciones con apariencia de neuritas, pero en su mayoría se observan con un aspecto redondeado o poligonal. En cada corte de 40  $\mu\text{m}$  se observan pocas células, por lo que, aunque no se realizó una cuantificación, se estima que la sobrevivencia de las células transplantadas fué baja (Fig. 8).



**Figura 7.-** Gráfica que muestra el curso temporal de la conducta de giro inducida por apomorfina. Se observan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los grupos transplantados y el grupo Testigo, treinta días post-transplante; sin embargo entre los grupos transplantados no se observan diferencias estadísticamente significativas.





**C** Endocrino

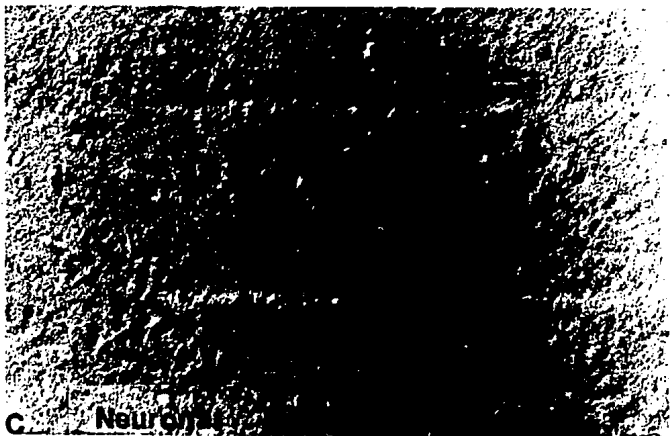


Figura 8.- Micrografías de células cromafines transplantadas en estriado denervado de rata. Las células son inmunorreactivas a TH y se observan a lo largo del trayecto de la cánula (A). Cuando fueron previamente neurogenizadas con NGF, se observan algunas células con fenotipo endocrino y otras con fenotipo neuronal (B); lo mismo en el caso de la neurogenización previa con campos magnéticos (C).

## DISCUSION

La síntesis y secreción de catecolaminas aunada a la capacidad de transformación hacia un fenotipo neuronal en presencia del NGF (Unsicker y cols, 1978), brindó una nueva posibilidad en el empleo de las células cromafines para aminorar las asimetrías motoras en la enfermedad de Parkinson (Freed y cols, 1981), eliminando los problemas éticos y clínicos del transplante de tejido fetal.

La capacidad de las células cromafines de adoptar un fenotipo neuronal es un modelo interesante para el estudio de la diferenciación celular. Si bien no se conocen de manera clara los mecanismos mediante los cuales el NGF promueve la diferenciación de las células cromafines, es evidente que se requiere su presencia física para desencadenar este proceso, siempre mediante interacciones ligando-receptor. Hasta este punto estas células no muestran ninguna particularidad en cuanto al mecanismo de inicio de la diferenciación, ya que, por muy complejo que éste resulte, estará desencadenado por la presencia del NGF como estimulador químico de receptores específicos. Esta estimulación química es, al parecer, específica; la presencia de otros factores como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) no provoca la neurogenización ni la inducción de las enzimas TH y PNMT (Unsicker y Westermann, 1992).



Todos los procesos celulares en los que participan cascadas de segundos mensajeros presentan un alto grado de complejidad funcional, por lo que su comprensión no es inmediata, sino requiere varios años de investigación con distintos enfoques. Así pues, el proceso de diferenciación celular y en especial el de neurogenización aún no ha sido comprendido. Si bien se sabe que en células PC12 la unión del NGF a su receptor trk con actividad de cinasa, desencadena la fosforilación de varias proteínas, la activación de otras cinasas y la inducción de ciertos genes (Hempstead, 1992), no se tiene del todo claro el papel del  $Ca^{2+}$  y de los genes inducidos. En cultivos de células de ganglio de la raíz dorsal de rata se ha demostrado que la disminución del  $Ca^{2+}$  de las pozas intracelulares disminuye la neurogenización, probablemente al impedir la acción de enzimas activadas por  $Ca^{2+}$  que actúan directamente sobre la expresión génica necesaria para la neurogenización (Kocsis, 1994).

El hallazgo de que las células cromafines se neurogenizan al ser estimuladas por campos magnéticos proporciona un nuevo paradigma de diferenciación celular en el que existe una variante importante: el estímulo que desencadena la neurogenización no es un estímulo químico, sino un estímulo físico. Este hecho abre nuevas interrogantes acerca de los procesos moleculares que intervienen en la diferenciación celular.

La estimulación con un campo magnético produce un campo eléctrico distribuido de manera uniforme sobre el área estimulada. La estimulación atraviesa sin atenuación los medios de cultivo y las células en monocapa empleadas en estudios *in vitro* (Bassen y cols, 1992). En estudios recientes se ha observado que el campo eléctrico inducido por el campo magnético contribuye por sí mismo de manera importante a la síntesis de RNA y se postula que es capaz de alterar la distribución de cargas de las membranas celulares y la orientación de biomoléculas cargadas (Greene y cols, 1991). En linfocitos, la estimulación con campos magnéticos reduce la mitosis interfiriendo directamente con la síntesis de DNA (Conti y cols, 1983). Una posible teoría es que la reducción del flujo de  $Ca^{2+}$  impida la actividad de síntesis de DNA (Conti y cols, 1985).

En células PC12 se ha cuantificado la liberación de  $[^3H]$ -NA inducida por campos magnéticos indicando que ésta requiere de  $Ca^{2+}$  extracelular, el cual al parecer se une a la superficie externa de la membrana celular y la hace muy sensible al estímulo; los cambios cooperativos de unión de  $Ca^{2+}$  pueden influir en la estabilidad de la membrana y promover la entrada de  $Ca^{2+}$  y la liberación vesicular (Dixey, 1982).

Las células cromafines cultivadas en este estudio mostraron un cambio fenotípico muy similar cuando fueron

estimuladas por el NGF (100 ng/ml) o por campos magnéticos de baja frecuencia (7 Gauss). Al parecer en los cambios producidos por la estimulación con el NGF participan proteínas cinasas y la inducción de proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$ . Koike y colaboradores (1989) propusó la hipótesis del "punto fijo de  $\text{Ca}^{2+}$ " la cual propone que debajo de un cierto nivel óptimo de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico libre, las neuronas requieren factores neurotróficos para sobrevivir y que arriba de este nivel sobreviven independientemente de los factores tróficos. En apoyo de esta hipótesis se ha descubierto que la pérdida de la dependencia al NGF en neuronas simpáticas en cultivos, está acompañada de un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular (Koike y Tanaka, 1991). Esta hipótesis podría ser la clave para la explicación de la neurogenización provocada por campos magnéticos. De este modo, el campo eléctrico que acompaña a la estimulación magnética podría provocar el movimiento de iones, entre ellos el  $\text{Ca}^{2+}$  el cual, al unirse cooperativamente a la membrana celular tendería a desestabilizarla, provocando una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este  $\text{Ca}^{2+}$  entrante y la movilización del proveniente de las pozas intracelulares desencadenaría la transcripción y provocaría la independencia celular de factores tróficos.

Lillien y Claude (1985) reportaron el papel del NGF como mitógeno de las células cromafines. Al parecer, el campo magnético podría estar actuando igualmente como mitógeno, ya que en cultivos primarios de células cromafines estimuladas

durante 144 horas con campos magnéticos se observan un gran número de "conglomerados celulares" (Drucker y cols, 1994) muy parecidos a los formados en presencia del NGF. Si los mecanismos que intervienen son similares a los propuestos en linfocitos por Conti y colaboradores (1985), un incremento en el flujo de  $Ca^{2+}$  provocado por el campo eléctrico podría estar activando la síntesis de DNA. Un posible experimento para apoyar o descartar esta idea sería bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  y medir la incorporación de timidina tritiada.

Las células cromafines no diferenciadas y aquellas diferenciadas por NGF o campos magnéticos no tienen al parecer, diferentes mecanismos de liberación de  $[^3H]$ -NA (Drucker y cols, 1994). Esta observación no permite sin embargo establecer si existen diferencias funcionales, a nivel enzimático por ejemplo, entre las células cuando son sometidas a las diferentes condiciones. Resulta claro que para elucidar las posibles diferencias, son necesarios análisis bioquímicos y moleculares comparativos.

La independencia de factores tróficos y la neurogenización de las células cromafines, promovidas por la estimulación con campos magnéticos, plantean la interrogante acerca de cómo será su comportamiento al ser colocadas en un nuevo ambiente celular en el que existen diversos procesos de señalización molecular.

Desde 1981, Freed y colaboradores transplantaron médula adrenal en el ventrículo lateral de animales con lesión nigroestriatal, basándose en la capacidad de las células cromafines de sintetizar y secretar catecolaminas. A través de los años se ha buscado optimizar las condiciones del trasplante para aumentar la sobrevida y los efectos terapéuticos.

Nishino y colaboradores (1988) observaron que las células cromafines de animales neonatos transplantadas en el caudado de rata tienen la capacidad de transformarse en neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, se cree que los efectos benéficos del trasplante de células cromafines en los pacientes con enfermedad de Parkinson y en el modelo animal de ésta, se deben a la gran cantidad de factores de crecimiento liberados más que a las pequeñas cantidades de dopamina secretadas. Existe la posibilidad de que estos factores causen un crecimiento de los axones remanentes, modulen la secreción de neurotransmisor, la sensibilidad de los receptores o faciliten el establecimiento de circuitos compensatorios (Unsicker, 1993).

Las células cromafines mantenidas en cultivo son funcionalmente activas y logran disminuir la conducta de giro en animales con lesión nigroestriatal (Kamo y cols, 1987). El cultivo tiene como ventajas el poder elegir las células más deseables para ser transplantadas, así como la posibilidad

de mantenerlas "saludables" *in vitro* por un tiempo relativamente largo. La observación de que el NGF provoca la diferenciación de estas células hacia un fenotipo neuronal, planteó la posibilidad de lograr una mejor integración dentro del cerebro hospedero al ser transplantadas, así como el posible reestablecimiento de conexiones dañadas. Sin embargo se debe considerar que el proceso de tripsinización previo al trasplante provoca la retracción de los procesos emitidos por las células *in vitro*. La desestabilización de la membrana celular afecta de manera importante la sobrevivencia del trasplante en el cerebro. Hasta la fecha no existen trabajos en los que se reporte el trasplante de células cromafines cultivadas y diferenciadas, por lo que no es posible realizar una comparación funcional de este procedimiento.

En este trabajo no se observaron diferencias significativas en la capacidad de disminuir la conducta de giro entre las células no diferenciadas y las diferenciadas con campos magnéticos o con NGF. Este hecho, podría estar indicando que los mecanismos mediante los cuales las células cromafines aminoran la conducta de giro, no se ven modificados cuando éstas permanecen *in vitro* y son estimuladas para diferenciarse. Tales mecanismos deben estar relacionados con la producción de factores tróficos, más que con la reconexión de la vía a través de los procesos emitidos por las células cromafines o por las neuronas nigrales remanentes.

En los cortes histológicos de los animales transplantados, se observa la presencia de un reducido número de células inmunorreactivas en los trasplantes de las células que recibieron NGF o estimulación magnética. Esta baja sobrevida se puede explicar quizá por el proceso de tripsinización, el cual afecta la membrana celular y dificulta la adaptación de las células al nuevo ambiente. Pese a la baja sobrevida celular, los grupos que recibieron trasplante mostraron una disminución significativa a los 30 días post-trasplante, del número de giros, con respecto al grupo que sólo recibió vehículo ( $p < 0.01$ ). Esta disminución es similar a la observada en otros reportes (Perlow y cols, 1979; Freed y cols, 1981).

Se ha observado que los trasplantes intraparenquimales de suspensiones celulares de sustancia nigra o de médula adrenal, aminoran significativamente la conducta de giro (Brown y Dunnett, 1989). Debido a la baja sobrevida de las células transplantadas relacionada con efectos conductuales, disminuyendo la conducta de giro, es posible inclinarse hacia la hipótesis de que el mecanismo de acción del trasplante de células cromafines es a través de la secreción de diversos factores tróficos, tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) el cual proporciona a las células cromafines una capacidad auto-heterocrina para mantenerse diferenciadas en términos de síntesis y almacenamiento de catecolaminas; factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-

βs) los cuales tiene efectos tróficos sobre neuronas, células gliales y otros tipos celulares; interleucinas (IL) como la IL-1β que incrementa el RNAm en astrocitos cultivados; NGF; factor neurotrófico ciliar (CNTF) el cual tiene efectos protectores en neuronas nigroestriatales axotomizadas; cromogranina B que induce el crecimiento de neuritas en neuronas de hipocampo cultivadas y al parecer puede tener efectos similares en otras poblaciones neuronales del SNC; y neuropéptidos tales como opiodes (Unsicker, 1993). También se ha observado que la glándula adrenal produce un factor liberador de dopamina, el cual estimula la liberación de ésta de las terminales estriatales de manera dosis-dependiente (Chang y Ramirez, 1988). En humano y en ratones con parkinsonismo inducido por MPTP, estos factores podrían actuar rescatando las fibras dopaminérgicas, modificando su actividad y posiblemente promoviendo la regeneración axonal, ya que se ha observado en exámenes postmortem, que existe reinervación dopaminérgica nigroestriatal en pacientes que recibieron transplante de células cromafines (Kordower y cols, 1991).



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten emitir las siguientes conclusiones:

- Las células cromafines poseen una alta capacidad de transformación fenotípica en respuesta al estímulo producido por los campos magnéticos. Esta respuesta es novedosa ya que se trata de un tipo de estimulación física que tiene la capacidad de desencadenar la respuesta celular de diferenciación, por lo que debe estar presente en la célula un mecanismo de transducción de este tipo de señales. El fenotipo adoptado por las células bajo estimulación magnética de 7 Gauss, es muy similar al producido por la presencia del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) en cultivo. Bajo estimulación con campos magnéticos, las células cromafines con fenotipo neural poseen una independencia trófica del NGF.

- Las células cromafines cultivadas durante siete días, poseen la capacidad de aminorar la conducta de giro inducida por apomorfina en ratas con lesión unilateral nigroestriatal provocada por 6-OHDA. Esta disminución es significativamente diferente respecto al grupo testigo, a los treinta días post-transplante y es sostenida a los cinco meses, lo que demuestra la funcionalidad de las células cultivadas. Las células cromafines diferenciadas hacia un fenotipo neuronal por NGF o campos magnéticos, poseen la misma capacidad de disminuir la

conducta, sin observarse una diferencia significativa con respecto a las células no neurogenizadas. Existe una ligera tendencia de las células diferenciadas por campos magnéticos a aminorar la conducta de giro.

- A cinco meses post-transplante, las células cromafines no diferenciadas y las diferenciadas sobreviven en el parénquima estriatal. La sobrevivida sin embargo es pobre y se ve aparentemente disminuida cuando las células fueron neurogenizadas previamente *in vitro*.

- Para conocer a fondo las características funcionales de las células cromafines son necesarios otros estudios que revelen los mecanismos que intervienen en el proceso de neurogenización, así como la transducción de la señal electromagnética dentro de la célula.

**BIBLIOGRAFIA**

Aaron, R.K., Ciombor, D.M. (1993) Therapeutic Effects of Electromagnetic Fields in the Stimulation of Connective Tissue Repair. *J. Cell. Biochem.* 52:42-46.

Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS* 12(10):366-374.

Andén, N.E., Dahlström, A., Fuxe, K., Larsson, K. (1966) Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons. *Acta Pharmac. Tox.* 24:263-274.

Andén, N.E. (1970) Effects of amphetamine and some other drugs on central catecholamine mechanisms. En *Amphetamines and Related Compounds*. Editores Costa E. & Garattini S. Raven Press. New York.

Backlund, E.O., Granberg, P.O., Hamberger, B., Knutsson, E., Martensson, A., Sedvall, G., Seiger, A., Olson, L. (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. *J. Neurosurg.* 62: 169-173.

Barker, A.T., Jalinous, R., Freeston, I.L. (1985) Non-Invasive Magnetic Stimulation of Human Motor Cortex. *Lancet.* i:1106-1107.

Bassen, H., Litovitz, T., Penafiel, M., Meister, R. (1992) ELF In Vitro Exposure Systems for Inducing Uniform Electric and Magnetic Fields in Cell Culture Media. *Bioelectromagnetics* 13:183-198.

Becker, J.B., Freed, W.J. (1988) Adrenal medulla grafts enhance functional activity of the striatal dopamine system following substantia nigra lesions. *Brain Res.* 462:401-406.

Berger, K., Przedborski, S., Cadet, J.L. (1991) Retrograde Degeneration of Nigrostriatal Neurons Induced by Intrastriatal 6-Hydroxydopamine Injection in Rats. *Brain Res. Bull.* 26:301-307

Bing, G., Notter, M.F.D., Hansen, J.T., Gash, D.M. (1988) Comparison of Adrenal Medullary Caroti Body and PC12 Cell Grafts in 6-OHDA Lesioned Rats. *Brain Res. Bull.* 20:399-406.

Björklund, A., Stenevi, U. (1979) Reconstructuion of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 177:555-560

Björklund, A., Stenevi, U. (1985) Intracerebral neural grafting: A historical perspective. En *Neural Grafting in the Mammalian CNS*. Editores Anders Björklund y Ulf Stenevi. Elsevier. Amsterdam.

- Bohn, M.C., Cupit, L., Marciano, F., Gash, D.M. (1987) Adrenal Medulla Grafts Enhance Recovery of Striatal Dopaminergic Fibers. *Science*. 237:913-916
- Bourguignon, G.J., Bourguignon, L.Y.W. (1989) Electric stimulation of human fibroblasts causes an increase in  $Ca^{2+}$  influx and the exposure of additional insulin receptors. *J. Cell Physiol*. 140:379-385.
- Brown, V.J., Dunnett, S.B. (1989) Comparison of adrenal and foetal nigral grafts on durg-induced rotation in rats with 6-OHDA lesions. *Exp. Brain Res*. 78: 214-218.
- Carlsson, A. (1959) The occurrence, distribution and physiologic role of catecholamines in the nervous system. Symposium on Catecholamines, Bethesda, Md. Octubre 16-18, 1958. *Pharmac. Rev*. 11:490-493
- Carpenter, M.B. (1984) Interconnections between the corpus striatum and brain stem nuclei. En *The basal ganglia structure and function*. Editores John S. McKenzie, Robert E. Kemm y Lynette N. Wilcock. Plenum Press.
- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocitotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:302-11
- Conti, P., Gigante, G.E., Cifone, M.G., Alesse, E., Ianni, G., Reale, M., Angeletti, P.U. (1983) Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by extremely low frequency electromagnetic fields. *FEBS Lett*. 162(1):156-160
- Conti, P., Gigante, G.E., Alesse, E., Cifone, M.G., Fieschi, C., Reale, M., Angeletti, P.U. (1985) A role for  $Ca^{2+}$  in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS Lett*. 181(1):28-32.
- Cotzias, G.C., Van Woert, M.H., Schiffer, L.M. (1967) Aromatic amino acid and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med*. 276:374-379
- Chang, G.D., Ramirez, V.D. (1988) A potent dopamine-releasing factor is present in high concentrations in the rat adrenal gland. *Brain Res*. 463:385-389
- Chevalier, C., Deniau, J.M. (1990) Disinbition as a basic process in the expression of striatal functions. *TINS* 13(7):277-280.
- Date, I., Felten, S.Y., Olschowka, J.A., Felten, D.L. (1990) Limited Recovery of Striatal Dopaminergic Fibers by Adrenal Medullary Grafts in MPTP-Treated Aging Mice. *Exp. Neurol*. 107:197-207.

- DeLong, M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS* 13(7):281-285.
- Deutch, A.Y., Elsworth, J.D., Goldstein, M., Fuxe, K., Redmond, D.E., Sladek, J.R., Roth, R.H. (1986) Preferential vulnerability of A8 dopamine neurons in the primate to the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurosci. Lett.* 68:51-56
- Dixey, R. (1982) <sup>3</sup>H-noradrenaline release potentiated in a clonal nerve cell line by low-intensity pulsed magnetic fields. *Nature.* 296:253-256.
- Dunnett, S. B., Björklund, A., Stenevi, U., Iversen, S.D. (1981) Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 215:147-161.
- Dunnett, S.B., Hernandez, T.D., Summerfield, A., Jones, G.H., Arbuthnott, G. (1988) Graft-derived recovery from 6-OHDA lesions: specificity of ventral mesencephalic graft tissues. *Exp. Brain Res.* 71:411-424
- Drucker-Colín, R., Madrazo, I., Ostrosky-Solís, F., Shkurovich, M., Franco, R., Torres, C. (1988) Adrenal medullary tissue transplant in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Progress in Brain Res.* 78:567-574
- Drucker-Colín, R. (1989) Parkinsonism, Adrenal Transplant. *Encyclopedia of neuroscience.* Adelman, G. (Ed.) Birkhauser Press. Suppl. 1, pp 133-135.
- Drucker-Colín, R., Verdugo-Díaz, L., Méndez, M., Carrillo-Ruiz, J., Morgado-Valle, C., Hernández-Cruz, A., Corkidi, G. 1994. Comparison between Low Frequency Magnetic (LFM) Field Stimulation and Nerve Growth Factor (NGF) treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties and grafting in nigro-striatal lesioned rats. *Mol. Cell. Neurosci.* En prensa.
- Freed, W.J., Morihisa, J.M., Spoor, E., Hoffer, B.J., Olson, L., Seiger, A., Wyatt, R.J. (1981) Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature.* 292:351-352
- Freed, W., Karoum, F., Spoor, H.E., Morihisa, J.M., Olson, L., Wyatt, R.J. (1983a) Catecholamine content of intracerebral adrenal medulla grafts. *Brain Res.* 269:184-189.
- Freed, W.J., Ko, G.N., Niehoff, D.L., Kuhar, M.J., Hoffer, B.J., Olson, L., Cannon-Spoor, H.E., Morihisa, J. M., Wyatt, R.J. (1983b) Normalization of Spiroperidol Binding in the Denervated Rat Striatum by Homologous Grafts of Substantia

Nigra. Science 222:937-939.

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

Freed, W.J., Poltorak, M., Backer, J.B. (1990) Intracerebral adrenal medulla grafts. A Review. Exp. Neurol. 110:139-166

Freed, W.J. (1993) Neural Transplantation: Prospects for clinical use. Cell Transpl. 2:13-31.

Graybiel, A.M. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. TINS 13(7):244-253.

Greene, L.A., Tischler, A. (1976) Establishment of a nonadrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 73:2424-2428.

Greene, L.A., Shooter, E.M., (1980) The nerve growth factor. Ann. Rev. Neurosci. 3:352-402

Greene, J.J., Skowronski, W.J., Mullins, J.M., Nardone, R.M. (1991) Delineation of Electric and Magnetic Field Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Radiation on Transcription. Biochem. Biophys. Res. Comm. 174(2): 742-749.

Goetz, C.G., Olanow, W. C., Koller, W.C., Penn, R.D., Cahill, D., Morantz, R., Stebbins, G., Tanner, C.M., Klawans, H.L., Shannon, K.M., Comella, C.L., Witt, T., Cox, C., Waxman, M., Gauger, L. (1989) Multicenter study of autologous adrenal medullary transplantation to the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. New England J. Med. 320(6):337-341

Hansen, J.T. (1988) Organization, fine structure and viability of human adrenal medulla: considerations for neural transplantation. Ann. Neurol. 24:599-611.

Harper, G.P., Pearce, F.L., Vernon, C.A. (1976) Production of nerve growth factor by mouse adrenal medulla. Nature. 262:251-253.

Hefti, F., Melamed, E., Wutman, R.J. (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. Brain Res. 195:123-137.

Hempstead, B.L., Rabin, S.J., Kaplan, L., Reid, S., Parada, L.F., Kaplan, D.R. (1992) Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. Neuron, 9:883-896

Herrera-Marschitz, M., Strömberg, I., Olson, D., Ungerstedt, U., Olson, L. (1984) Adrenal Medullary Implants in the Dopamine-Denervated Rat Striatum. II. Acute Behavior as a Function of Graft Amount and Location and its Modulation by Neuroleptics. *Brain Res.* 297:53-61

Hsu, S.M., Raine, L. y Fauger, H. (1981) The use of avidine-biotine-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and inlabeled antibody (PAP) procedures). *J. Histochem. Cytochem.* 29:557-580

Jiao, S., Ding, Y., Zhang, W., Cao, J., Zhang, G., Zhang, Z., Ding, M., Meng, J. (1989) Adrenal Medullary Autografts in patients with Parkinson's disease. *New England J. Med.* 321(5): 325-326

Johnson, D., Lanaham, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* 47:545-554

Kamo, H., Kim, S.U., McGeer, P.L., Tago, H., Shin, D.H. (1987) Transplantation of Cultured Human Adrenal Chromaffin Cells Into 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rat Brain. *Synapse* 1:324-328.

Kocsis, J.D., Rand, M.N., Lankford, K.L., Waxman, S.G. (1994) Intracellular Calcium Mobilization and Neurite Outgrowth in Mammalian Neurons. *J. Neurobiol.* 25(3):252-264.

Koike, T., Martin, D.P., Johnson, E.M. (1989) Role of  $Ca^{2+}$  channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal  $Ca^{2+}$  determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6421-6425.

Koike, T., Tanaka, S. (1991) Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival *in vitro* may be determined by the levels of cytoplasmic free  $Ca^{2+}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:3892-3896

Kordower, J.H., Cochran, E., Penn, R.D., Goetz, C.G. (1991) Putative Chromaffin Cell Survival and Enhanced Host-derived TH-Fiber Innervation Following a Functional Adrenal Medulla Autograft for Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* 29(4):405-412

Korsching, S. (1993) The Neurotrophic Factor Concept: A Reexamination. *J. Neurosci.* 13(7):2739-2748.

Langston, J.W., Ballard, P.A., Tetrud, J.W., Irwin, I. (1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product pf meperidina-analog synthesis. *Science.* 219:979-980.

Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E.B., Forno, L.S. (1984) Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates.

Science. 225:1480-1482.

Langston, J.W., Irwin, I., Ricaurte, G.A. (1987) Neurotoxins, parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmac. Ther.* 32:19-49.

Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1951) Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exptl. Zool.* 116:321-62

Levi-Montalcini, R. (1987) The Nerve Growth Factor 35 Years Later. *Science.* 237:1154-1162

Lillien, L.E., Claude, P. (1985) Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature.* 317:632-634.

Madrazo, I., Drucker-Colín, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C., Becerril, J.J. (1987) Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *New England J. Med.* 316:831-834

Madrazo, I., León, V., Torres, C., Aguilera, M C., Varela, G., Alvarez, F., Fraga, A., Drucker-Colín, R., Ostrosky, F., Skurovich, M., Franco, R. (1988) Transplantation of fetal Substantia Nigra and Adrenal Medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *New England J. Med.* 318(1):51

Nishino, H., Ono, T., Shibata, R., Kawamata, S., Watanabe, H., Shiosaka, S., Tohyama, M., Karadi, Z. (1988) Adrenal medullary cells transmute into dopaminergic neurons in dopamine-depleted rat caudate and ameliorate motor disturbances. *Brain Res.* 445:325-327.

Olson, L., Seiger, A., Freedman, R., Hoffer, B. (1980) Chromaffin Cells Can Innervate Brain Tissue: Evidence from Intraocular Double Grafts. *Exp. Neurol.* 70:414-426

Olson, L., Strömberg, M., Herrera-Marschitz, M., Ungerstedt, U., Ebendal, T. (1985) Adrenal Medullary Tissue Grafted to the Dopamine-Denervated Rat Striatum: Histochemical and functional Effects of Additions of Nerve Growth Factor. En *Neural Grafting in the Mammalian CNS.* Editores Anders Björklund y Ulf Stenevi. Elsevier. Amsterdam.

Paravicini, U., Stoeckel, K., Thoenen, H. (1975) Biological Importance of Retrograde Axonal Transport of Nerve Growth Factor in Adrenergic Neurons. *Brain Res.* 84: 279-291.

Paxinos, G. y Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2ª Edición. Academic Press. New York.



Perlow, M.J., Freed, W.J., Hoffer, B.J., Seiger, A., Olson, L., Wyatt, R.J. (1979) Brain Grafts Reduce Motor Abnormalities Produced by Destruction of Nigrostriatal Dopamine System. *Science* 204:643-646.

Pezzoli, G., Fahn, S., Dwork, A., Truong, D.D., de Yebenes, J.G., Jackson-Lewis, V., Herbert, J., Cadet, L.J. (1988) Non-chromaffin tissue plus nerve growth factor reduces experimental parkinsonism in aged rats. *Brain Res.* 459:398-403

Pycock, C.J. (1980) Turning behaviour in animals. *Neuroscience* 5:461-514.

Ricaurte, G.A., Langston, J.W., DeLsnney, L.E., Irwin, I., Brooks, J.A. (1985) Dopamine uptake blockers protect against the dopamine depleting effects of MPTP in the mouse striatum. *Neurosci. Lett.* 59:259-264

Rosenstein, J.M. (1987) Adrenal medulla grafts produce blood-brain barrier dysfunction. *Brain Res.* 414:192-196.

Roth, R.H., Wolf, M.E., Deutch, A.Y. (1987) *Neurochemistry of Midbrain Dopamine Systems in Psychopharmacology: The Third Generation of Progress* editado por Herbert Y. Meltzer, Raven Press, New York.

Roth, B.J., Saypol, J.M., Hallett, M., Cohen, L.G. (1991) A theoretical calculation of the electric field induced in the cortex during magnetic stimulation. *Electroencepha. Clin. Neurophys.* 81: 47-56.

Schwab, M.E. (1990) Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *TINS* 13(11):452-456

Seidl, K., Manthorpe, M., Varon, S., Unsicker, K. (1987) Differential Effects of Nerve Growth Factor and Ciliary Neurotrophic Factor on Catecholamine Storage and Catecholamine Synthesizing Enzymes of Cultured Rat Chromaffin Cells. *J. Neurochem.* 49(1): 169-174.

Snider, W.D., Johnson, E.M. (1989) Neurotrophic Molecules. *Ann Neurol.* 26(4): 489-506.

Spencer, D.D., Robbins, R.J., Naftolin, F., Phil, D., Marek, K.L., Vollmer, T., Leranath, C., Roth, R.H., Price, L.H., Gjedde, A., Bunney, B.S., Sass, K.J., Elsworth, J.D., Kier, E.L., Makuch, R., Hoffer, P.B., Redmond, E. (1992) Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *New England J. Med.* 327(22): 1541-1548

Strömberg, I., Herrera-Marschitz, M., Hultgren, L., Ungerstedt, U., Olson, L. (1984) Adrenal Medullary Implants

in the Dopamine-Denervated Rat Striatum. I. Acute Catecholamine Levels in Grafts and Host Caudate as Determined by HPLC-Electrochemistry and Fluorescence Histochemical Image Analysis. *Brain Res.* 297: 41-51.

Strömberg, I., Herrera-Marschitz, M., Ungerstedt, U., Ebendal, T., Olson, L. (1985) Chronic implants of chromaffin tissue into the dopamine-denervated striatum. Effects of NGF on graft survival, fiber growth and rotational behavior. *Exp. Brain Res.* 60: 335-349.

Stuchly, M.A., Esselle, K.P. (1992) Factors Affecting Neural Stimulation With Magnetic Fields. *Bioelectromagnetics Suppl.* 1:191-204.

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

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

Ungerstedt, U. (1971) Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced regeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol. Scan. Supple.* 367:69-93.

Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U., Thoenen, H. (1978) Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: Impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75(7):3498-3502

Unsicker, K., Westermann, R. (1992) Basic fibroblast growth factor promotes transmitter storage and synthesis in cultured chromaffin cells. *Devl. Brain Res.* 65:211-216.

Unsicker, K. (1993) The Trophic Cocktail Made by Adrenal Chromaffin Cells. *Exp. Neurol.* 123:167-173

Walters, A.M., Clarke, D.J., Bradford, H.F., Stern, G.M. (1992) The Properties of Cultured Fetal Human and Rat Brain Tissue and Its Use as Grafts for the Relief of the Parkinsonian Syndrome. *Neurochem. Res.* 17(9):893-900

Wictorin, K., Brundin, P., Sauer, H., Lindvall, O., Björklund, A. (1992) Long Distance Directed Axonal Growth From Human Dopaminergic Mesencephalic Neuroblast Implanted Along the Nigrostriatal Pathway in 6-Hydroxydopamine Lesioned Adult Rats. *J. Comp. Neurol.* 323:475-494.

Widner, H., Tetrad, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Björklund, A., Lindvall, O., Langston, W.J. (1992) Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *New England J. Med.* 327(22):1556-

Zigmond, M.J., Stricker, E.M. (1989) Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *Int. Rev. Neurobiol.* 31:1-79.