

39
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA TOXICIDAD DE
LA L-DOPA SOBRE CELULAS CROMAFINES
CULTIVADAS CON TRANSDIFERENCIACION
NEURAL"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALEPH ALEJANDRO CORONA MORALES

L



DIRECTOR: DRA. EN C. LIMEI ZHANG.

FECHA DE ENTREGA: 1998
LUGAR: CIENAS

26 8412

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Estudio Morfológico de la Toxicidad de la L-DOPA sobre Células Cromafines
Cultivadas con Transdiferenciación Neural"

realizado por ALEPH ALEJANDRO CORONA MORALES

con número de cuenta 9354985-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	
Propietario	Dra. limei Zhang Ji
Propietario	Dr. Andrés Castell Rodríguez
Propietario	Dra. Margarita García Garduño
Suplente	Dr. Javier Ramos Carvajal
Suplente	Dra. Verónica Guarner Lans

[Handwritten signatures: limei Zhang Ji, Andrés Castell Rodríguez, Margarita García Garduño, Javier Ramos Carvajal, Verónica Guarner Lans]

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature: Edna María Suárez Díaz]

Dra. Edna María Suárez Díaz

FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA

**Dedico esta tesis a las personas que más amo,
mi madre Socorro, mi padre Tomás, mi hermana
Gabriela y mis abuelas Esperanza y Neri.**

**"Únicamente los hombres convencidos
de que pueden cambiar el mundo,
lo hacen"**

Corona A.A. Toxicidad de la L-DOPA sobre células cromafines transdiferenciadas

Me encuentro profundamente agradecido con mi directora de tesis, Dra. Limei Zhang por el apoyo y amistad que en todo momento me ha brindado, además de su infinita enseñanza, disposición y paciencia. Igualmente mil gracias al Dr. Andrés Castell por su imprescindible colaboración, ayuda y consejos que siempre me ha dado.

Gracias a mis sinodales Dra. Margarita García Garduño, Dra. Verónica Guarnier Lans, Dr. Javier Ramos Carvajal, Dr. Andrés Castell Rodríguez y Dra. Limei Zhang Ji por su cooperación en la revisión de la tesis.

Agradezco el apoyo técnico para la realización de este trabajo a Miguel Herrera Enriquez, Beatriz Hernández Téllez, Alberto Hernández Peñaloza, Judith Alvarez Pérez y Fernando Carbajal.

A Selma, Vanessa, Isela, Patricia, Edith, Itzé, Judith, Carlos, Mauro, Ulises, Mauricio, Miguel, Alberto y Willis por su amistad.

ÍNDICE

I. Resumen	4
II. Introducción	5
II.1 Generalidades	5
II.2 Biosíntesis de las catecolaminas y sus metabolitos	9
II.3 Radicales libres y el estrés oxidativo	11
II.3.1 Qué es un radical libre y el estrés oxidativo	11
II.3.2 Especies reactivas de oxígeno	12
II.3.3 Sistemas antioxidantes	17
II.3.4 Relación entre el estrés oxidativo y la EP	19
II.3.5. Toxicidad de la L-DOPA en cultivo.	21
III. Hipótesis, planteamiento del problema y objetivos	24
IV. Material y Método	26
V. Resultados	29
VI. Discusión y conclusiones	35
VII. Referencias	41
VIII. Apéndice	46

Abreviaturas usadas:

AT	Azul Tripano
DA	Dopamina
EP	Enfermedad de Parkinson
GSH	Glutación Reducido
GSH-Px	Glutación Peroxidasa
GSSG	Glutación Oxidado
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino Oxidasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimethylthiazol 2-yl) -2,5-difenyltetrazolio
µl	Microlitro
µM	Micromolar
NE	Norepinefrina
NO	Óxido Nítrico
RN	Recién Nacidos
SN	Sustancia Nigra
SNc	Sustancia Nigra pars compacta
SOD	Superóxido Dismutasa
TH	Tirosina Hidroxilasa

I. RESUMEN

Esta tesis reporta el desarrollo y resultados principalmente morfológicos de un modelo celular. Este modelo experimental tiene como objetivo indagar el efecto de la aplicación corta y subcrónica de la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA o levedopa) sobre cultivos de células cromafines con transdiferenciación neural. El experimento consiste en los siguientes procesos: 1) cultivar células aisladas de médula suprarrenal de dos grupos de ratas Wistar: recién nacidos y ratas de 10 días; 2) aplicar L-DOPA en tres dosis: 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M a partir del segundo día del cultivo con cambio de medio cada 24 horas; 3) examinar la viabilidad celular con Azul Tripano (AT) y toxicidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); 4) examinar la densidad y morfología de las células cromafines usando técnicas inmunocitoquímicas y microscopía fotónica; 5) análisis de datos usando estadística descriptiva. Los resultados indican que la L-DOPA tiene efecto tóxico sobre las células cromafines transdiferenciadas, a mayor dosis, mayor efecto tóxico.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Generalidades

La L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA o levodopa) es el medicamento de elección para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson (EP) (Berkow y Flecher, 1992). La característica más prominente de esta enfermedad es la degeneración progresiva del grupo de neuronas dopaminérgicas de la **substantia nigra pars compacta** (SNc) del mesencéfalo. En estos pacientes, las células nerviosas en la SNc que inervan los núcleos de los ganglios basales, núcleos Caudado y Putamen, (nominado estriado en roedores por la presencia de estrías que se pueden observar en los cortes histológicos por medio de microscopía óptica) degeneran. Como sus terminales axónicas desaparecen, los niveles de dopamina (DA) en los ganglios basales disminuyen y aparecen los desórdenes motores característicos: dificultad para iniciar movimiento (acinesia), rigidez muscular y temblor en reposo e inestabilidad postural (Kurlan, 1995).

Uno de los triunfos tempranos de la neurofarmacología fue la invención de la técnica de la terapia de reemplazo para el tratamiento de la EP. La idea fue intentar aliviar los síntomas de la enfermedad restableciendo los niveles de DA en los ganglios basales. Se sabía que la DA no atravesaba la barrera hematoencefálica, por lo que desde entonces se ha empleado la molécula precursora de la DA - la L- DOPA. Los pacientes que han recibido dosis orales de la L- DOPA han mostrado impresionantes mejorías durante los primeros años de la terapia y las autopsias de los que fallecieron durante estos años de tratamiento mostraron concentraciones casi normales de la DA

en los ganglios basales. Supuestamente, las neuronas dopaminérgicas que todavía están en la SNc de los enfermos son capaces de sintetizar y liberar suficiente transmisor si les proporcionan precursores extras, como un mecanismo de compensación.

El tratamiento prolongado con la L-DOPA trae consigo varios efectos colaterales tales como movimientos involuntarios (discinesia), anormalidades neuropsiquiátricas, etc. También se observan, de manera frecuente, fluctuaciones debilitantes en la respuesta motora después de una dosis de levodopa, conocida como respuestas "on" y "off". Además, la progresión de la enfermedad se asocia con sintomatología que no responde a la levodopa, por lo que después de 10 años de tratamiento con esta sustancia, en la mayoría de los enfermos de EP ya no pueden controlar adecuadamente el sistema motor (Kurlan, 1995).

Una estrategia terapéutica alternativa es el reemplazo de las células degeneradas por otras células que eventualmente podrían tomar la función de las degeneradas (Lindvall, 1991). Se han desarrollado dos modalidades: el trasplante de neuronas dopaminérgicas de la SNc fetal y el trasplante de células cromafines de la médula suprarrenal. Se ha demostrado que las neuronas fetales que se han transplantado en el sistema nervioso central (SNC) del paciente adulto sobreviven y establecen contactos sinápticos. Sin embargo, sus axones raramente se extienden más allá de unos cuantos milímetros, por lo que los implantes se deben de colocar cerca de las células blanco. La principal dificultad de esta opción es la obtención del donador para el trasplante (Olanow, 1995). El autotransplante de la médula

suprarrenal representa otra opción relativamente fácil en este aspecto (Madrazo y Drucker-Colín, 1987; Freed, 1990; Anglade, 1993).

Las células cromafines de la médula suprarrenal provienen del linaje simpatoadrenal de la región dorsal del tubo neural durante el desarrollo embriológico (Black, 1992; Unsicker, 1993; Islas-Suárez, 1994). La migración de las células de este linaje se inicia ventralmente del ápice del tubo neural a la aorta dorsal. Estas células se agregan y diferencian en una cadena primaria simpática en la que hay células que expresan marcadores neurales (por ejemplo, neurofilamentos) como las neuronas simpáticas, y otras no expresan estos marcadores neurales como las cromafines. Por otro lado, la médula suprarrenal consiste principalmente en células cromafines que son eléctricamente excitables, sintetizan y liberan neurotransmisores y está inervada por fibras simpáticas pre-ganglionares, a diferencia de otras glándulas puramente endócrinas que están inervadas por fibras post-ganglionares. Desde este punto de vista, la médula suprarrenal puede considerarse como un ganglio simpático. Las células cromafines poseen alta potencia de plasticidad y manifiestan su fenotipo dependiendo de su entorno. Es bien conocido que existen dos tipos de diferenciación celular, el primero es conocido como diferenciación autónoma, que se lleva a cabo siguiendo un programa genético determinado. El otro tipo es denominado diferenciación regulada por el entorno (o transdiferenciación) (Alberts, 1993; Chalmers, 1995). Aquí, los factores determinantes son las señales críticas provenientes del microambiente que rodean la célula; también es un factor primordial la interacción con células adyacentes y juega un papel crítico en todas las etapas de desarrollo del sistema nervioso central. Las interacciones locales entre células del sistema nervioso se llevan a cabo a través de

señales electromagnéticas, moléculas señalizadoras extracelulares, expresión de receptores en la membrana de la célula blanco, etc. (Lindvall, 1991; Unsicker, 1993; Zhang, 1997).

Las células cromafines poseen todos los sustratos necesarios para sintetizar y liberar catecolaminas, incluyendo DA (ver con detalle en la sección de Biosíntesis de Catecolaminas), por lo cual estas células son candidatos calificados para el tratamiento quirúrgico de la EP.

En reportes preliminares de cocultivo celular (Zhang, 1996, 1998) hemos observado que en presencia de las neuronas estriatales, la transdiferenciación neural de la célula cromafín de la médula suprarrenal se incrementa y que ésta establece contactos sinápticos con las neuronas estriatales. El crecimiento neurítico es direccional y la formación de contactos sinápticos es seleccionada espacialmente. La liberación de dopamina se incrementa por un factor de 3 igualando la concentración de epinefrina.

Sin embargo, los resultados del trasplante de la médula suprarrenal para los enfermos de la EP han sido objeto de controversia ya que en los casos tratados se ha observado mejoría transitoria y resultados totalmente negativos. Los estudios anatómicos e histopatológicos en algunos casos humanos y en los animales experimentales no han podido demostrar que los niveles de dopamina hayan aumentado en forma permanente después del trasplante, ni tampoco se ha demostrado que las células de implante establezcan sinapsis con las células del núcleo

caudado; más aún, los estudios realizados han comprobado que el trasplante tiende a degenerar a la necrosis total.

Un dato clínico nos ha llamado la atención: a la mayoría de los pacientes post-trasplante de médula suprarrenal les han seguido prescribiendo la administración de L-DOPA, con el fin de mantener la remisión de la sintomatología de la EP mientras "se desarrollan las células transplantadas y toman su función".

En años recientes, varios estudios (Mena, 1993; Mytilineou, 1993; Smith, 1994; Pardo, 1995; Raiput, 1997; Cheng, 1996) han mostrado la toxicidad de la L-DOPA y DA sobre diferentes tejidos del sistema nervioso, debido a su metabolismo enzimático y su auto-oxidación que pueden dar lugar a la producción de radicales libres, peróxidos de hidrogeno, semiquinonas y quinonas que son potencialmente tóxicos (Fig. 1).

II. 2 Biosíntesis de Catecolaminas y sus metabolitos

Las catecolaminas son sustancias que tienen un núcleo catecol con un anillo benzénico adyacente hidroxilado en los carbonos 3 y 4; los transmisores catecolaminérgicos - dopamina, noradrenalina y adrenalina - provienen de una sola vía biosintética, en donde el precursor es el aminoácido tirosina y están involucradas cinco enzimas. (Fig. 1).

La primera de las enzimas es una oxidasa llamada tirosina hidroxilasa (TH), que convierte la tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta es la enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas y requiere del cofactor pteridina (Pt) en su forma

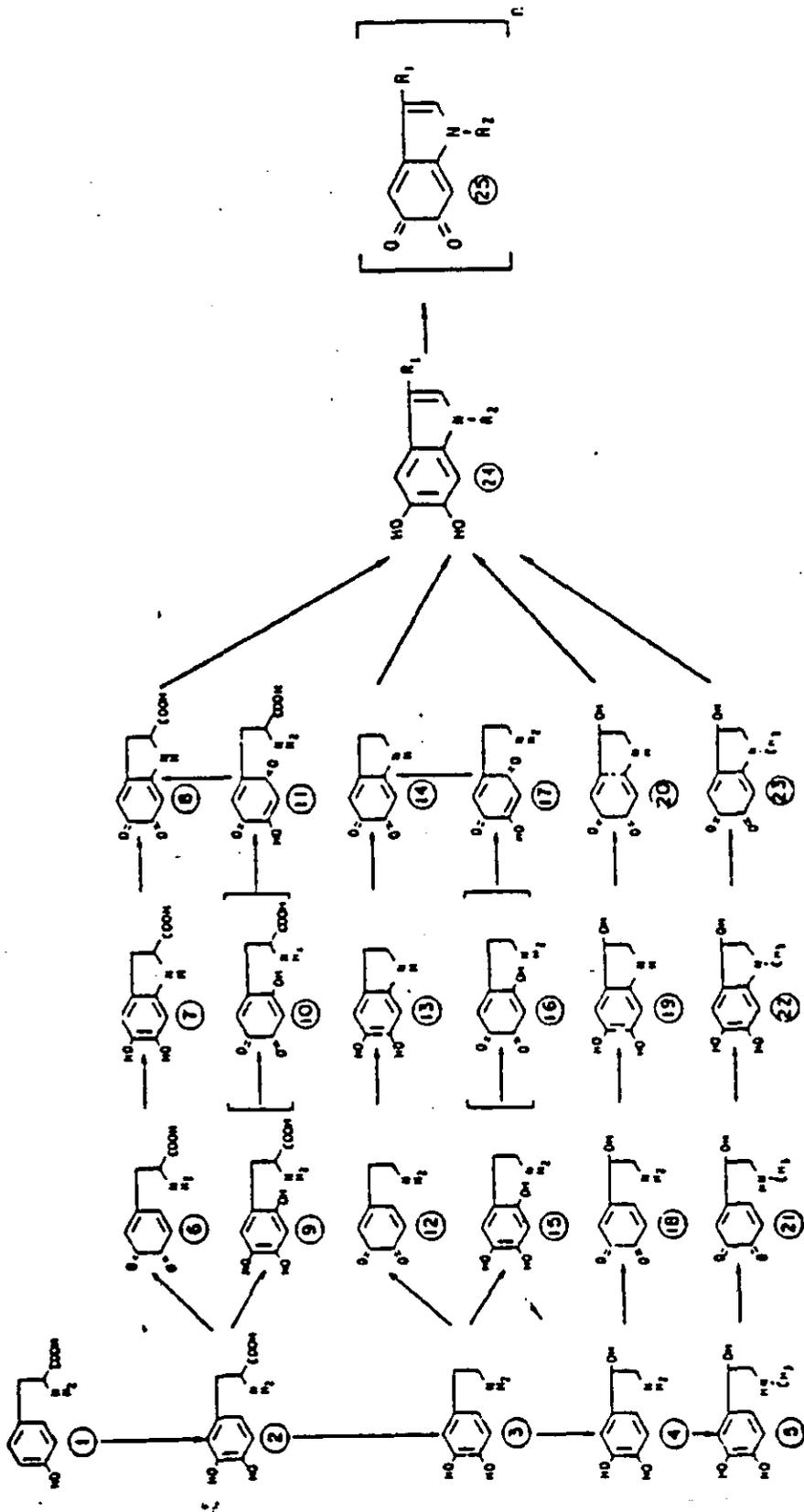


Fig. 1 Las vías oxidativas de las catecolaminas. 1. tirosina ; 2. dopa ; 3. dopamina ; 4. noradrenalina ; 5. adrenalina ; 6. dopaquinona (radical libre, RL) ; 7. leukodopacromo ; 8. dopacromo ; 9. topa ; 10. o-quinona (RL) ; 11. p-quinona (RL) ; 12. dopamina ; 13. dopamina ; 14. aminocromo ; 15. 6-hidroxi-dopamina ; 16. o-quinona - 6 - hidroxidopamina (RL) ; 17. p-quinona - 6 - hidroxidopamina (RL) ; 18. o-quinona - noradrenalina (RL) ; 19. leuconoradrenocromo ; 20. noradrenocromo ; 21. o-quinona - adranalina (RL) ; 22. leucoadrenocromo ; 23. adrenocromo ; 24. dihidroxi-indol ; 25. indol-quinona (RL). (Graham et al., 1978)

reducida. Una vez sintetizada la L-DOPA, esta es descarboxilada por la L-DOPA descarboxilasa para formar (DA) y CO₂. A continuación, por acción de la DA-hidroxilasa, la DA es convertida a norepinefrina (NE). En la médula adrenal la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa, metila la NE para formar epinefrina con ayuda de S-adenosilmetionina como donador del grupo metilo (Granham, 1978).

II.3. Radicales libres y el estrés oxidativo

II.3.1 Qué es un radical libre y el estrés oxidativo

Un compuesto estable, como la gran mayoría de las moléculas biológicas, poseé electrones con *spines* apareados, es decir, en direcciones opuestas. Sin embargo, existen especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados en sus órbitas externas, los radicales libres. Debido a la tendencia natural al apareamiento electrónico, la presencia de estos electrones no apareados induce a un radical a reaccionar rápidamente con otro radical libre u otra molécula ya sea al donar o tomar un electrón. Por lo tanto, estas especies químicas son altamente reactivas y de vida media muy corta, y el proceso lleva a una reacción en cadena no enzimática: un radical genera otro y así sucesivamente, hasta que la molécula se aparea con un electrón desapareado de otra molécula. Al estado en el que se encuentra la célula debido a esta serie de reacciones es a lo que se le llama estrés oxidativo (Pichardo y Passi, 1997).

En los sistemas biológicos, los radicales libres formados tienden a reaccionar con distintos componentes celulares y extracelulares como son lípidos insaturados,

proteínas, ácidos nucleicos, azúcares, metabolitos intermedios y otros. Las consecuencias de estas reacciones son citotoxicidad, mutaciones, aberraciones cromosomales, carcinogénesis, degeneración y muerte celular.

II.3.2 Especies Reactivas de Oxígeno

A. Radical anión superóxido (O_2^-)

El oxígeno molecular es en realidad un birradical, ya que posee dos electrones no apareados con el mismo número de *spin*. Debido al arreglo paralelo del *spin*, la reducción de un electrón prevalece sobre la reducción de los dos electrones.



En las células aeróbicas, la más importante fuente de O_2^- (vida media 0.4-1000 μs) es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y en el retículo endoplásmico.

En la mitocondria, algunos componentes de la cadena respiratoria, en particular el complejo formado por la coenzima Q (CoQ) reductasa y NADH y las formas reducidas de CoQ, filtran pequeñas cantidades de electrones que van a reducir al O_2 y

de esta manera se forman O_2^- y $HO\cdot$ (reducción univalente). Debido a que la mitocondria contiene, como una parte integral de un sistema de membranas, una alta proporción de fosfolípidos con un alto grado de insaturación, la formación de estos radicales representa un potencial peligro (Pichardo, 1997).

B. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

La formación de H_2O_2 se debe a la dismutación de superóxido. Por lo tanto, cualquier sistema biológico que genere O_2^- producirá H_2O_2 . Además, hay enzimas localizadas en los peroxisomas que producen H_2O_2 sin la intermediación de O_2^- . Aunque no es un radical libre, el H_2O_2 puede inactivar directamente ciertas enzimas al reaccionar con sus grupos sulfidrilos. A diferencia del O_2^- , el H_2O_2 es capaz de cruzar la membrana celular y reaccionar con ciertos metales en su forma reducida (Fe^{2+} o Cu^+) para formar radicales hidroxilo ($HO\cdot$) por la reacción de Fenton y de esta manera tener su efecto tóxico (Pichardo, 1997).

C. Radical Hidroxilo ($HO\cdot$)

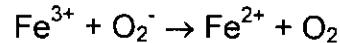
Como mencionado anteriormente, la reacción de Fe^{2+} o Cu^+ con H_2O_2 es una fuente para la que la formación de $HO\cdot$ *in vivo* esté presente:



Indiscutiblemente, los $HO\cdot$ se forman en todo sistema que genera O_2^- de acuerdo a la ecuación general:



No obstante, es bien sabido que tales reacciones se catalizan en presencia de iones metálicos. Estos iones, preferencialmente Fe^{3+} , son reducidos por O_2^- y luego oxidados por H_2O_2 :



La reacción de Haber-Weiss catalizada por un metal involucra la participación de hierro o cobre en forma libre o secuestrado en forma de complejos con nucleótidos, ferritina, lactoferrina, hemoglobina y mioglobina. El radical hidroxilo es extremadamente reactivo (vida media 0.3 nseg). por lo que se combina con cualquier molécula que se encuentre presente en el sitio de su formación (Pichardo, 1997).

D. Singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

Esta molécula (vida media μ -mseg) se puede generar debido a una alta sensibilidad hacia la luz a ciertas longitudes de onda de algunas moléculas como son riboflavina y sus derivados (FMN, FAD)

El singulete de oxígeno también se puede generar durante la fagocitosis o por dismutación espontánea de O_2^- .

E. Óxido Nítrico (NO)

El NO se forma a partir de uno de los átomos de nitrógeno de la L-arginina y la enzima responsable es la NO sintetasa, proteína citoplasmática dependiente de NADH. El NO es un neurotransmisor en el sistema nervioso central y es un agente citotóxico de macrófagos activados. Los macrófagos también son capaces de producir nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) a partir de arginina. El NO puede reaccionar con grupos Fe-S, provocando la desactivación de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial. También, el NO puede reaccionar con O_2^- para formar, además de NO_3^- , el anión pentoxinitrito, el cuál rápidamente genera $\text{HO}\cdot$ (Pichardo, 1997).

F. Lipoperóxidos

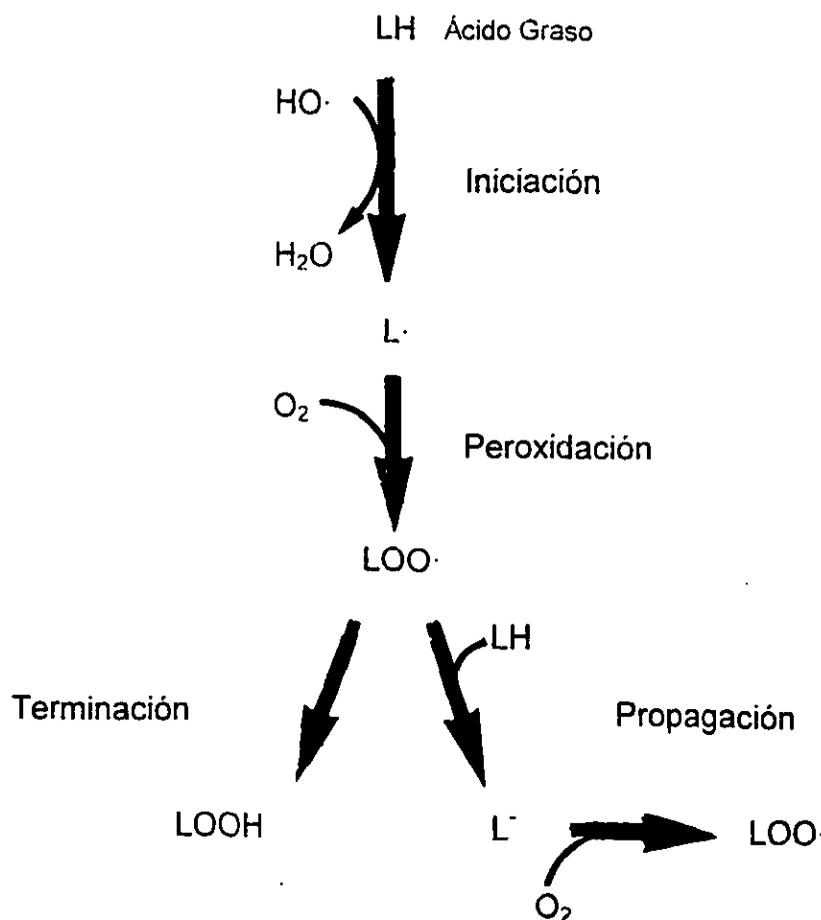
Muchas de las funciones de las células inmunes dependen de señales en la membrana y por lo tanto su constitución lipídica es vital para una respuesta correcta. Los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana, presentes en todos los fosfolípidos, tienen un papel preponderante en la fisiología celular por medio de dos mecanismos básicos :

1. Mantenimiento de la integridad y fluidez de la membrana, en conjunto con colesterol (estructural).
2. Biosíntesis de eicosanoides regulatorios -Prostaglandinas, leucotrienos- (regulación).

La fluidez de la membrana es esencial para el funcionamiento de la trasducción de señales y movimiento de los receptores. Sin embargo, los ácidos grasos

mecanismos por los cuales el estrés oxidativo influye sobre la respuesta inmune celular. El estrés oxidativo, de hecho, puede ser definido como un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, donde los primeros prevalecen.

La actividad de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados trae como consecuencia que se formen productos alterados, algunos de los cuales continúan siendo radicales altamente reactivos, a los que se les llama lipoperóxidos. La lipoperoxidación comienza después de la extracción de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado por una especie radical, como se ilustra en la fig. siguiente



II.3.3 Sistemas antioxidantes

Las células poseen sistemas para protegerse del daño celular causado por el estrés oxidativo a través de "atrapadores", siendo enzimas o estructuras químicas tanto de origen endógeno como exógeno. Los sistemas antioxidantes biológicos pueden dividirse en dos grupos: el sistema primario y el sistema secundario.

El sistema primario previene el daño oxidativo al atrapar las especies tóxicas directamente. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de O_2^- para formar O_2 y H_2O_2 . Existen dos isoformas: la SOD dependiente de manganeso (MnSOD) que se encuentra en las mitocondrias y la SOD dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn SOD) localizándose en el citoplasma de la mayoría de las células de los mamíferos.

Dado que la SOD produce H_2O_2 , el cuál, a pesar de no ser un radical es altamente propenso a formarlos, trabaja en conjunto con dos enzimas capaces de eliminar el H_2O_2 formado: la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). La GSH-Px cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) a expensas de H_2O_2 o hidroperóxidos, los cuales son convertidos a H_2O e hidroxilípidos, respectivamente (Pichardo, 1997).

El sistema secundario actúa transformando el radical libre en una molécula menos reactiva. Uno de los compuestos más poderosos es el α -tocoferol (vitamina E) el cual se encuentra en el interior de las membranas, en lipoproteínas plasmáticas y en las glándulas adrenales. El tocoferol al reaccionar con O_2^- y $HO\cdot$ protege a las membranas de estas especies altamente reactivas. Sin embargo, su mayor acción la

ejerce al ser un antioxidante que interrumpe las reacciones en cadena de los radicales en las membranas biológicas; esto lo logra al donar un hidrógeno a la especie reactiva. El radical tocoferil así formado no es suficientemente reactivo como para inducir oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados, debido a que su electrón no apareado en el átomo de oxígeno puede ser deslocalizado en su anillo aromático. La reducción del tocoferil se lleva a cabo por el ubiquinol (ubiquinona reducida CoQH_2), antioxidante liposoluble presente en mitocondrias y en todas las membranas celulares.

Además del tocoferol, existen otros atrapadores de radicales libres como son el ácido ascórbico, β -caroteno y otros resumidos en la siguiente tabla:

Endógenos	Exógenos
<p>Enzimáticos</p> <p>GSH-PX (dependiente de Selenio) GSH-Px (no dependiente de Selenio) Catalasa Mn-SOD Cu-Zn-SOD Tiorredoxina reductasa</p> <p>No enzimáticos</p> <p>GSH Tioles Ubiquinona Ácido Úrico</p>	<p>Presentes en alimentos</p> <p>Vitamina E Tocoferoles y tocotrienoles Ácido Ascórbico β-caroteno Carotenoides Fenoles Flavonoides</p>

II.3.4 Relación entre el estrés oxidativo y la EP

El cerebro parece tener alto riesgo de daño frente al ataque de los radicales libres. Los ácidos grasos poliinsaturados son el mayor constituyente de las membranas celulares y un sustrato para la peroxidación lipídica. Además, el hierro, el cual promueve la formación de radicales citotóxicos, se acumula en regiones específicas del cerebro, tal como el *globus pallidus* y la SN, en concentraciones mayores a aquellas encontradas en otros tejidos, como por ejemplo, el hígado. Por otra parte, los mecanismos de defensa del cerebro son relativamente deficientes. El cerebro casi no contiene catalasa y, en comparación con el hígado, sus niveles de GSH, GSH-Px y vitamina E se encuentran reducidos. En el plasma, hay normalmente suficiente transferrina para unirse completamente al hierro y limitar la probabilidad de formación de radicales hidroxilo (OH⁻) llevada a cabo por hierro. Pero esto puede no ser el caso para el sistema nervioso central, donde la capacidad de unirse al hierro parece estar limitada.

Neuronas de la SNc pueden ser particularmente vulnerables al estrés oxidativo debido a que el propio metabolismo oxidativo de la DA tiene el potencial de generar radicales libres. La DA puede ser oxidada a través de dos vías: 1) por medio de la MAO-B o 2) por auto-oxidación en la que se genera H₂O₂. El H₂O₂ es normalmente detoxificado por la GSH en una reacción catalizada por GSH-Px, pero un incremento en la tasa de oxidación de la DA o una deficiencia en la disponibilidad de GSH podría

resultar en un incremento en la concentración normal de H_2O_2 , y en presencia de hierro reactivo, provocar la formación de $OH\cdot$ (reacción de Fenton).

Hay razones de peso para pensar que los radicales libres están involucrados en la EP:

- La oxidación de DA probablemente se incrementa en las neuronas sobrevivientes con el resultado de un aumento en la formación de H_2O_2 .
- Los niveles de glutatión total y reducido se encuentran por debajo de lo normal, sugiriendo una deficiente protección contra la formación de $OH\cdot$.
- La concentración de hierro está incrementada en la SNc, lo cual incrementa la probabilidad de reaccionar con peróxido de hidrógeno y consecuentemente formar $OH\cdot$.
- Hay aumento de peroxidación lipídica en la SNc (Gerlach, 1996).

Todos estos hechos apuntan a que en la EP la SNc se encuentra en un estado de estrés oxidativo. Más aún, se ha encontrado que existe disminución en los niveles de GSH en pacientes que se les han observado cuerpos de Lewy en autopsia y parecer tener EP en un estado preclínico. Esto hace pensar que el estrés oxidativo puede estar presente en los estadios más tempranos de la enfermedad y que una deficiencia de GSH pudiera ser crucial para la neurodegeneración.

Además, cabe la posibilidad de que el hierro pueda ser la causa primaria del estrés oxidativo en la EP debido a su conocida propensión para promover citotoxicidad. Se ha observado que los niveles de ferritina se encuentran reducidos en la EP (Gerlach, 1996).

II.3.5 Toxicidad de la L-DOPA en cultivo

El tratamiento con L-DOPA al promover estrés oxidativo acelera la degeneración neuronal en la EP debido al potencial de llevar a cabo un metabolismo oxidativo y generar especies oxidantes altamente reactivas.

Las complicaciones motoras asociadas al tratamiento prolongado de la L-DOPA empiezan a aparecer generalmente entre los cinco y diez años de haber comenzado la terapia. Al inicio, estas complicaciones son moderadas, pero conforme pasa el tiempo, se incrementan hasta llegar a ser el mayor problema para los pacientes.

Aunque la efectividad de la L-DOPA en los enfermos de Parkinson no se cuestiona, en las investigaciones de los últimos años ha surgido el interés en el hecho de que el tratamiento crónico con esta droga está estrechamente asociado con el desarrollo de efectos adversos en la gran mayoría de los pacientes. Estos efectos incluyen fluctuaciones motoras, discinesias y problemas neuropsiquiátricos. Además, con el progreso de la enfermedad, van apareciendo nuevos síntomas que no

responden a la terapia de L-DOPA, como son hipotermia, inestabilidad en la postura, caídas, disfunción autónoma y demencia.

Hay gran cantidad de estudios que demuestran los efectos tóxicos de la L-DOPA sobre células dopaminérgicas del mesencéfalo *in vitro*. Aunque los mecanismos que llevan a esta citotoxicidad no están completamente identificados, hay abundante evidencia en la que se encuentran involucrados los radicales libres generados ya sea por la auto-oxidación de la L-DOPA y DA o por la degradación enzimática de la DA. La protección contra estos radicales libres por medio de antioxidantes apoya más estas investigaciones.

Debido a los efectos colaterales que surgen del tratamiento prolongado con L-DOPA, se han desarrollado otras vías por medio de las cuales se busca el controlar y aminorar los síntomas de la EP. Una de estas vías es el transplante de SN fetal o el autotransplante de células cromafines de la médula suprarrenal con transdiferenciación neuronal en regiones adyacentes al núcleo estriado: las cavidades ventriculares, el parénquima cerebral y las cavidades del parénquima cerebral. Se busca que el tejido transplantado esté en contacto con el fluido cerebroespinal, el cual provee al tejido los nutrientes que se requieren.

Las células cromafines y las neuronas simpáticas derivan de las células precursoras simpatoadrenales de las crestas neurales. Señales del microambiente recibidas durante la migración y consolidación del órgano determinan si el precursor llegará a ser una neurona simpática o una célula cromafin. De este modo, la exposición a ciertos factores tróficos como son el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y el

Factor de Crecimiento Neural (NGF) durante el desarrollo inducen la diferenciación hacia neuronas simpáticas, mientras que la presencia de altos niveles de glucocorticoides en la glándula adrenal inhibe la diferenciación neural e induce al fenotipo cromafin (Zhang, 1996).

Las células cromafines poseen un alto grado de plasticidad fenotípica. Cuando se encuentran rodeadas de células de la corteza adrenal, son células redondas y absorben-liberan grandes cantidades de epinefrina, pero cuando son extraídas de la glándula y colocadas en cultivo, cambian morfológica y bioquímicamente, liberando significantes cantidades de DA (Zhang, 1998).

Las células cromafines *in vitro*, aún aquellas de animales adultos, retienen la capacidad de dividirse y adoptar características del fenotipo neural cuando son expuestas al NGF, como son crecimiento de prolongaciones dendríticas y la formación de una red neurítica.

Puesto que la finalidad del transplante en el núcleo caudado es reestablecer la función nigroestriatal, las células cromafines presentan una alternativa importante.

Debido a la toxicidad de la L-DOPA demostrada en neuronas estriatales *in vitro* y al hecho de que a los pacientes de EP se les administra esta droga después de haber sido sometidos a transplante de células de la médula suprarrenal, es de vital importancia estudiar los probables efectos morfológicos del medicamento en estas células en cultivo.

III. HIPÓTESIS, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Con base en las evidencias experimentales anteriores, proponemos un estudio morfológico, al cocultivo de células cromafines de la médula suprarrenal y neuronas del núcleo caudado, usando técnicas de cultivo de tejido, inmunocitoquímica y análisis morfológico para determinar la susceptibilidad de las células cromafines transdiferenciadas frente a diferentes factores del microambiente tales como la L-DOPA, sus metabolitos oxidantes (radicales libres) y los posibles antioxidantes para neutralizar el efecto tóxico (lipoperoxidación) de los radicales libres en cultivo celular (y que posteriormente darán lugar a un modelo animal *in vivo*).

IV. 1 Hipótesis

La aplicación de periodo corto y subcrónico de la L-DOPA al cocultivo de células cromafines transdiferenciadas provoca efectos tóxicos que se reflejan en muerte celular. Las células vivas pueden presentar morfología patológica.

IV. 2 Objetivos

1. Lograr la transdiferenciación de las células cromafines cocultivadas con las neuronas del estriado.
2. Aplicar la L-DOPA con diferentes dosis teniendo como punto de referencia la dosis que se usa en los pacientes con EP.
3. Examinar la viabilidad usando la técnica con Azul tripano.

4. Examinar el daño celular usando la técnica con MTT.
5. Examinar la densidad de células cromafines usando técnicas inmunocitoquímicas.
6. Examinar la morfología celular usando técnica de microcopía fotónica.
7. Analizar conjuntamente los datos para tener una conclusión y proponer futuros experimentos.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

Se usaron ratas Wistar que fueron criadas en el bioterio de la Facultad de Medicina. Se separaron en dos grupos de experimentación: ratas recién nacidas (grupo RN) y ratas de diez días (grupo J) (Islas-Suárez, 1994).

Cultivo celular Se llevó a cabo la disección y extracción de ambas glándulas suprarrenales bajo condiciones de esterilidad. El tejido se colectó en una caja de Petri con solución Spinner (SSS) sin calcio. Bajo un microscopio de disección se separó la médula de la corteza. El tejido se enjuagó tres veces con solución SSS y se depositó en un tubo esteril para incubación con SSS más 2 mg/ml de colagenasa I y 2 µg de DNAsa tipo I. El tejido se disoció mecánicamente haciéndolo pasar a través de una pipeta Pasteur varias veces y se incubó por 45 min. a 37°C en baño María. Posteriormente, se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos y se resuspendió con la pipeta Pasteur en la solución de disociación y se lavó dos veces bajo las mismas condiciones de centrifugación. El botón se suspendió en medio DMEM. A las cajas de Petri previamente se les dió un tratamiento para adhesión celular con poli-L-lisina (Zhang, 1996). Para el caso de las neuronas, se obtuvieron a partir del estriado y el procesamiento de cultivo fue exactamente igual que en el caso de las células cromafines. Ambos tipos celulares se sembraron 1:1 a una densidad de 1×10^6 células/ml en cajas de Petri de 24 pozos (400 µl/pozo).

Administración de L-DOPA. Después de 48 hrs. de cultivo, se administró la L-DOPA. Para esto, los cultivos tanto RN como J se separaron en cuatro grupos, de acuerdo a la

dosis : grupo control, grupo 100 μM , grupo 200 μM y grupo 300 μM . Transcurridos cinco días, se llevarón a cabo las pruebas de viabilidad y densidad celular.

Medición de la viabilidad celular con Azul Tripano Se preparó una solución salina con 0.4% de Azul tripano (Solución AT). Se incubaron las cajas de cultivo con esta solución durante 5 minutos y se enjuagaron tres veces con solución fisiológica. Se efectuó el conteo inmediatamente con ayuda de un microscopio óptico.

Medición colorimétrica de la citotoxicidad con MTT. El MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolio) es una sal de tetrazolio hidrosoluble. Se puede obtener una solución de color amarilla disolviéndola en medio de cultivo (sin rojo fenol), solución salina o PBS. El MTT disuelto se convierte en formazan de color púrpura no soluble en agua al anclar el anillo del tetrazolio a las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias. Este formazan no hidrosoluble puede volver a solubilizarse en ácido isopropanol u otros solventes y el material disuelto se puede medir espectrofotométricamente. La absorbancia (570nm) es directamente proporcional a la concentración de la tinción convertida (Mosmann, 1983)

Se disolvió el MTT (Sigma M 5655) 5mg/ml in PBS para obtener una solución stock, que se filtró con filtros de 0.22 μm (Micropore) y se guardó a una temperatura de 2 - 8 °C para usos frecuentes o se congeló para utilizarla en periodos extensivos. Para medir la citotoxicidad, se agregaron 40 μl de la solución stock a los pozos que contenían 400 μl de medio de cultivo y se incubaron por 3-4 horas. Hacia el final del

periodo de la incubación se retiró todo el medio de cultivo y se le agregó el solvente de isopropanol ácido (0.1- 0.04 N de HCl) y PBS en una proporción de 1:1. La absorbancia de la tinción se midió con un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm restando la densidad óptica del fondo en 630 nm.

Imunohistoquímica: Se retiró el medio de cultivo con tres lavados de solución salina de buffer de fosfatos (PBS) 0.1M pH 7.4. Los cultivos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS frío por 20 minutos, se volvieron a hacer tres lavados con la misma solución de PBS y se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 minutos. Se hicieron dos lavados con PBS y un tercero con PBS-albúmina-tween. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario antiTH diluido 1:2000 a 4°C por 24 horas. Se continuó con tres lavados con la solución antes mencionada de PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo anti ratón biotinilado durante una hora a 37°C. A continuación, se volvieron a lavar con PBS y se les añadió el complejo conjugado estreptavidina-peroxidasa durante una hora a 37°C. Le siguieron tres lavados con PBS y se revelaron con la solución de diaminobencidina (DAB) por 5 minutos. Finalmente se contratiñeron con hematoxilina de Meyer y se montaron en portaobjetos.

Conteo celular. Para el caso de los cultivos tratados con Azul Tripano e inmunohistoquímica con anti-TH, se llevó a cabo el conteo celular en un microscopio óptico Nikon . El microscopio despliega un rectángulo, el cual mide 0.68 mm x 0.45 mm con objetivo X20, de modo que el número de células contadas correspondía a un área de 0.306 mm² y se extrapoló a 1 mm².

V. RESULTADOS

Usando la técnica para evaluar la viabilidad se obtienen los siguientes resultados: A) en los cultivos con tratamiento de L-DOPA hay mayor cantidad de células teñidas por Azul Tripano por área. La Fig. 2a muestra un ejemplo de control comparando con la 2b que es un ejemplo de un cultivo después de tratamiento con L-DOPA de 300 μ M. Se puede observar la presencia del colorante dentro de muchas células tratadas. La Figura 3a y 3b presentan los histogramas de densidad de células vivas usando Azul Tripano de los dos grupos experimentales. Se puede observar que la densidad celular decae con mayor dosis de L-DOPA. En el grupo RN (Fig. 3a), tomando como 100% de viabilidad el grupo control, la disminución fue al 76.21% en 100 μ M, al 53.5% en 200 μ M y al 39.95 en 300 μ M. Para el caso de las células juveniles, el comportamiento a las diferentes concentraciones es muy similar que en las RN, es decir, la viabilidad es inversamente proporcional a la concentración de L-DOPA. La densidad celular disminuyó al 78.92% en 100 μ M, al 60.64% en 200 μ M y al 49.24% en 300 μ M respecto al control (Fig. 3b). El resultado de la medición colorimétrica con MTT coincide con los resultados antes mencionados. (Fig. 4).

Usando la técnica inmunocitoquímica se examinaron la densidad de células TH inmunoreactivas. La densidad celular disminuye al 67.9% en 100 μ M, a 49.53% en 200 μ M y a 35.4% en 300 μ M con respecto al control en el grupo RN. La disminución es significativa en todos los casos (Fig. 5a, 5b, 5c, 5d y Fig. 6a). En el grupo J, la densidad



Fig. 2. Fotomicrografías de dos cocultivos celulares del grupo RN a diferentes dosis de L-DOPA sometidas a la prueba de viabilidad con Azul Tripano. a) control; b) dosis de 300 μ M. Puede observarse la presencia del colorante dentro de células no viables. Amplificación, a) X100, barra=40 μ m; b) X200, barra=20 μ m.

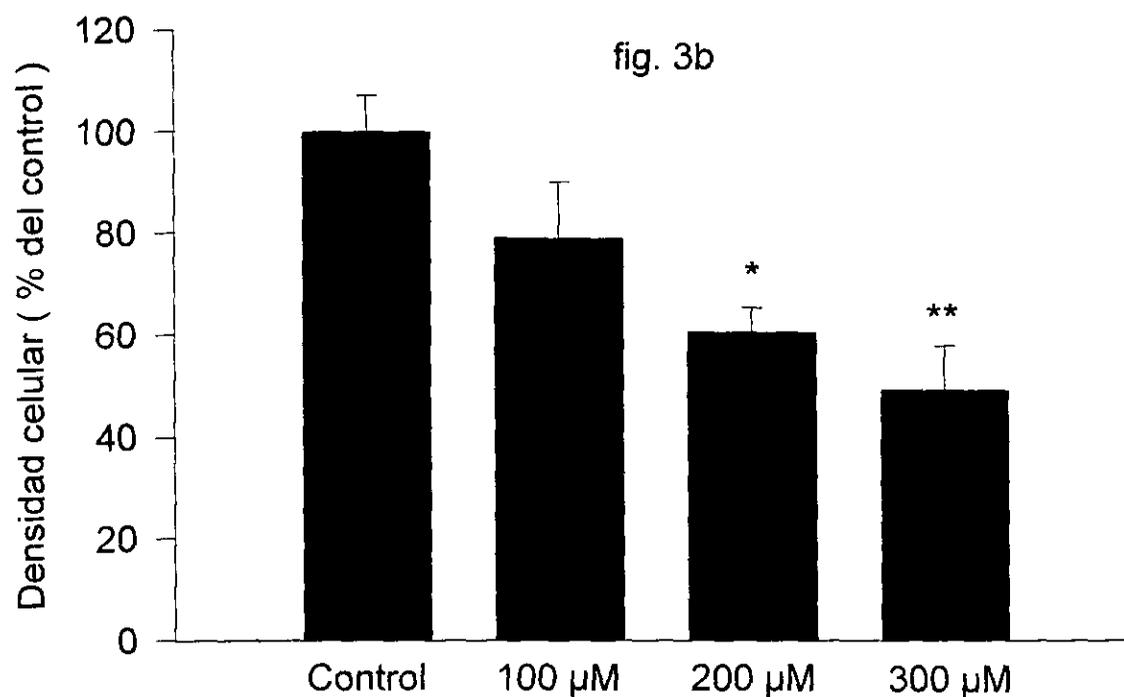
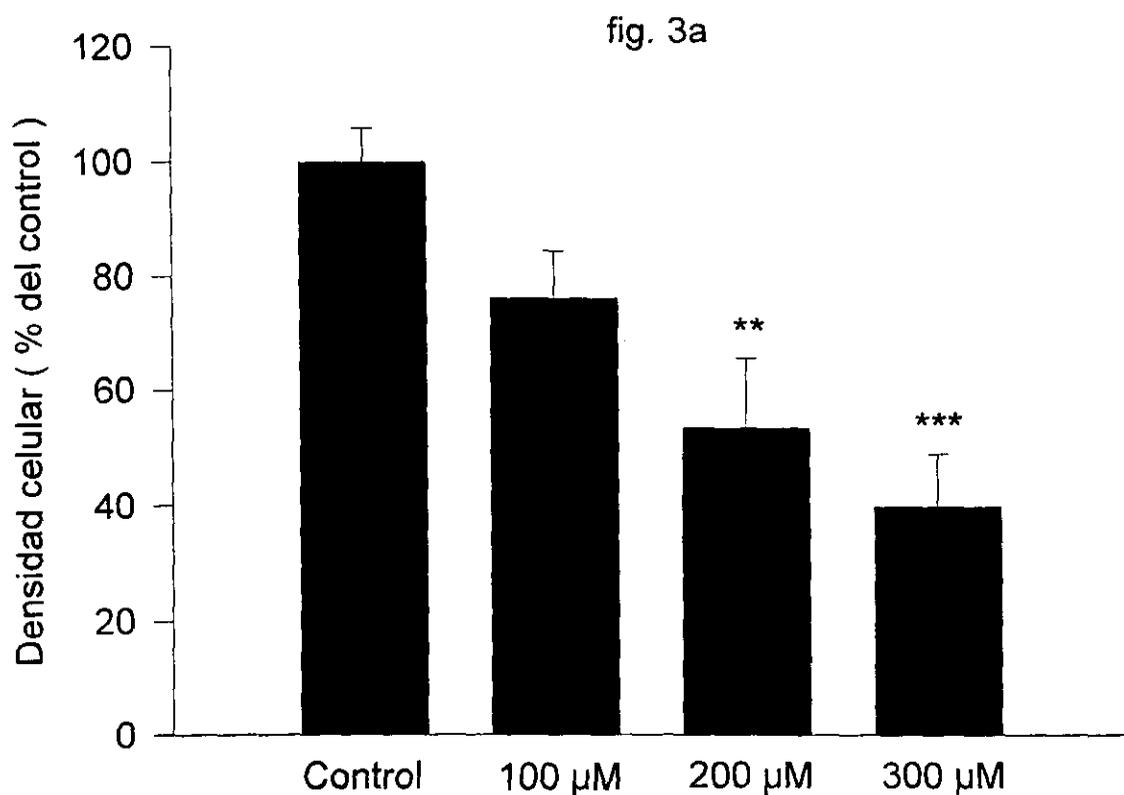


Fig 3. Histogramas que muestran la densidad de células viables por unidad de área a las diferentes dosis de L-DOPA por la técnica de AT. 3a. grupo RN y 3b. grupo J. La densidad de los controles está designado como 100%. Los datos indican la media \pm DE (** $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, prueba de Student-Newman-Keuls).

fig. 4b

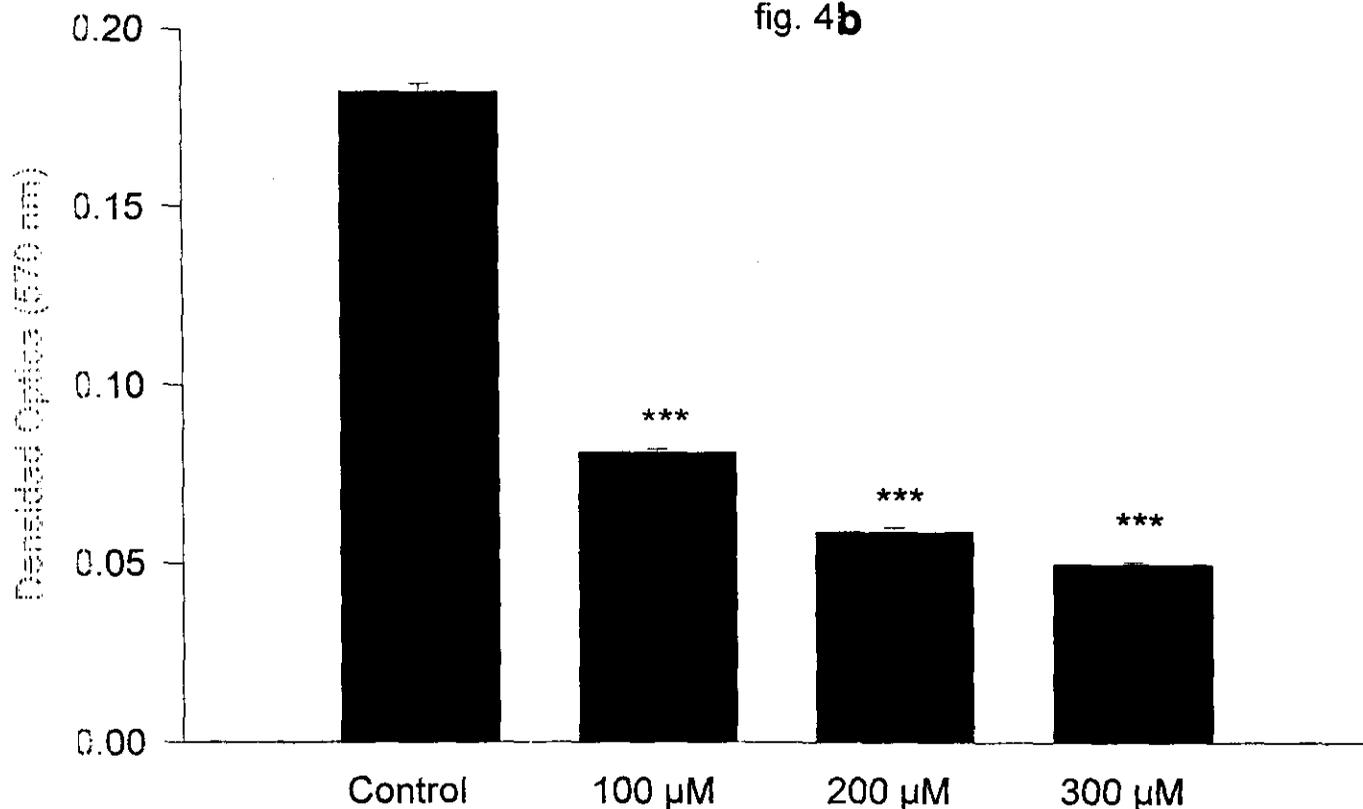


fig. 4a

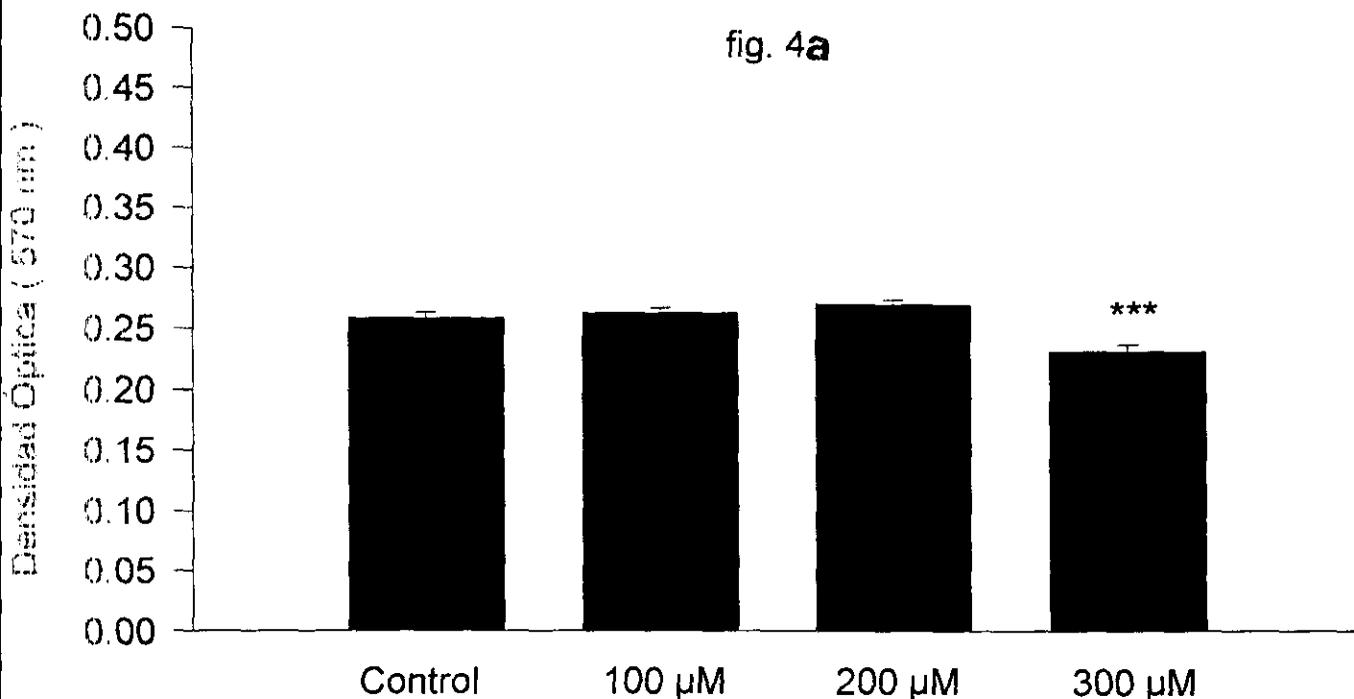


Fig. 4. Histograma de la viabilidad celular con la técnica de MTT que muestra la densidad óptica (DO) del a) grupo RN y b) grupo J, con las distintas concentraciones de L-DOPA. Los datos indican la media \pm DE (***) $p < 0.001$, prueba de Student-Newman-Keuls).

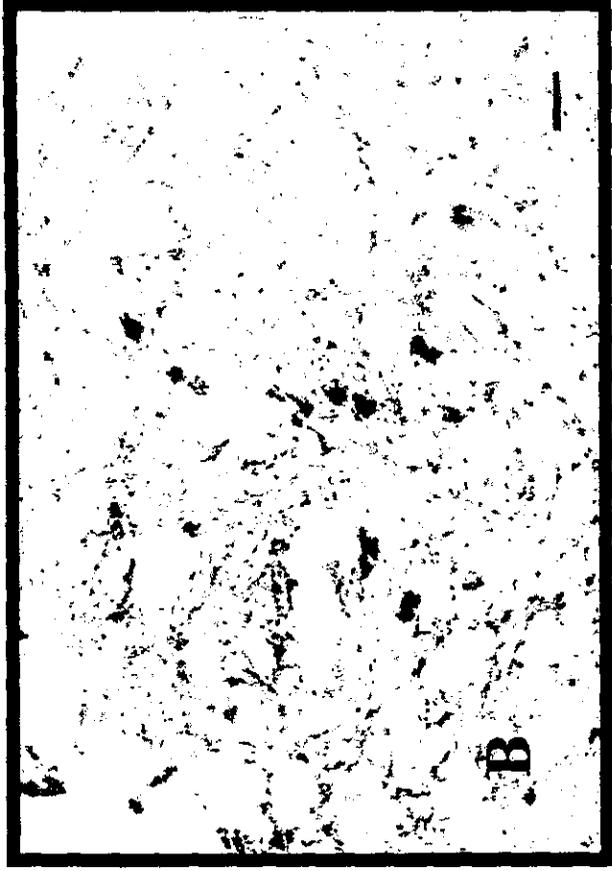
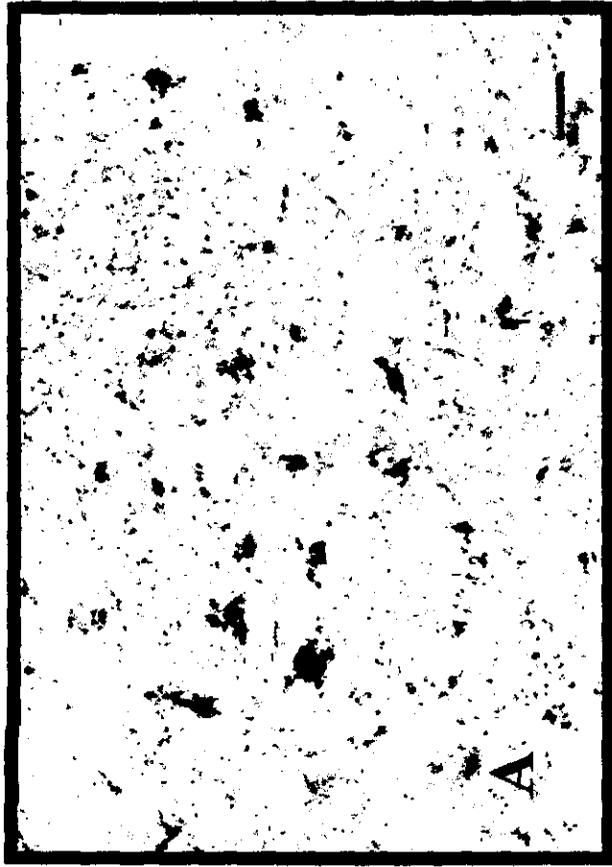


Fig. 5. Fotomicrografías de células cromafines de ratas recién nacidas (RN) cocultivadas con neuronas estriatales tratadas a distintas concentraciones de L-DOPA. a) control; b) 100 μ M; c) 200 μ M; d) 300 μ M. Las células cromafines (TH+) se observan de color oscuro. Contraintención de núcleos con hematoxilina. Amplificación X40. Barra=100 μ m.

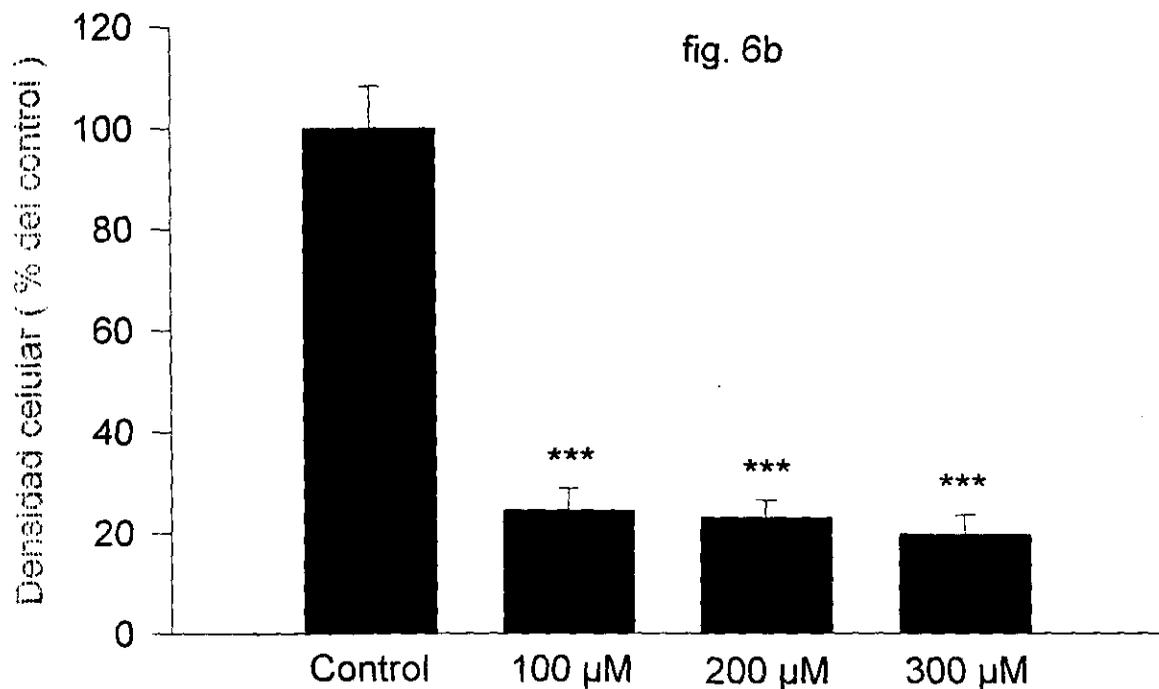
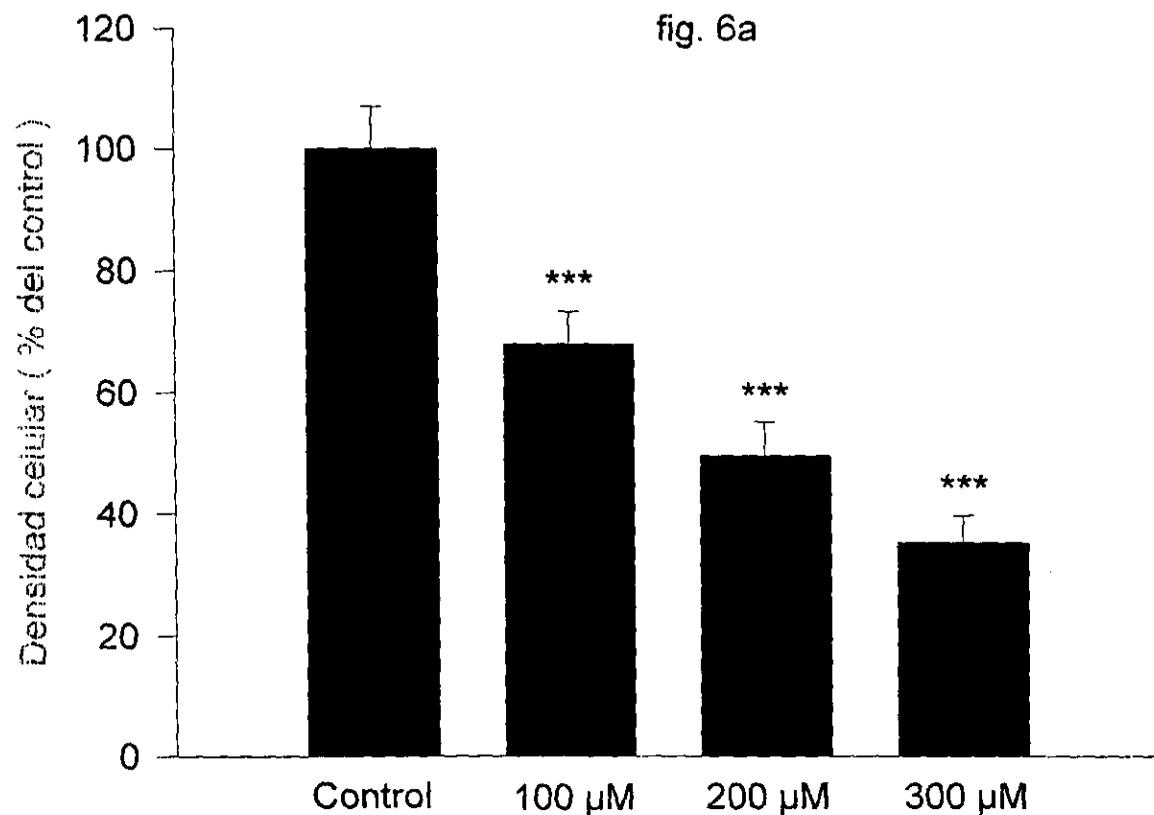


Fig. 6. Histograma que muestra la densidad celular de cocultivos de 6a. RN y 6b. J expresada en porcentaje respecto al control del número de células TH inmunorreactivas con las diferentes concentraciones de L-DOPA. Los datos indican la media \pm DE (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, prueba de Student-Newman-Keuls).

de células juveniles disminuye al 24.51% en 100 μM , a 22.96% en 200 μM y a 19.6% en 300 μM , con respecto al control (Fig. 7a, 7b, 7c, 7d, y Fig. 6b).

Se observaron células TH+ dañadas con vacuolización del citoplasma y fragmentación del núcleo con una clara expulsión de ellos, lo cual produjo abundantes micro-núcleos (Fig. 8a, 8b, 8c, 8d).

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede mencionar que las células cromafines responden de distinta manera frente al mismo estímulo - L-DOPA- en distintos estadios de maduración, como son en RN y juvenil. Mientras que en el caso de los RN se requieren dosis de 200 μM para dañar la mitad de la población de células cromafines, dosis menores a 100 μM se observa que se provocan el mismo efecto en la población de células juveniles. Evidentemente, las células juveniles son más sensibles al efecto de la L-DOPA que las RN, lo cual coincide con el hecho de que las células en transplantes se desarrollen mejor si son fetales o RN que adultas.

Si el daño es debido a la formación de radicales libres causada por la degradación de la L-DOPA y DA, las células RN pueden presentar mayor capacidad de contrarrestar este daño por estas moléculas altamente reactivas, ya sea por una mayor concentración de moléculas atraparoras (ácido ascórbico, tocoferol, etc.) o por una superior expresión y/o actividad de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, glutatión peroxidasa).

de células juveniles disminuye al 24.51% en 100 μM , a 22.96% en 200 μM y a 19.6% en 300 μM , con respecto al control (Fig. 7a, 7b, 7c, 7d, y Fig. 6b).

Se observaron células TH+ dañadas con vacuolización del citoplasma y fragmentación del núcleo con una clara expulsión de ellos, lo cual produjo abundantes micro-núcleos (Fig. 8a, 8b, 8c, 8d).

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede mencionar que las células cromafines responden de distinta manera frente al mismo estímulo - L-DOPA- en distintos estadios de maduración, como son en RN y juvenil. Mientras que en el caso de los RN se requieren dosis de 200 μM para dañar la mitad de la población de células cromafines, dosis menores a 100 μM se observa que se provocan el mismo efecto en la población de células juveniles. Evidentemente, las células juveniles son más sensibles al efecto de la L-DOPA que las RN, lo cual coincide con el hecho de que las células en transplantes se desarrollen mejor si son fetales o RN que adultas.

Si el daño es debido a la formación de radicales libres causada por la degradación de la L-DOPA y DA, las células RN pueden presentar mayor capacidad de contrarrestar este daño por estas moléculas altamente reactivas, ya sea por una mayor concentración de moléculas atraparoras (ácido ascórbico, tocoferol, etc.) o por una superior expresión y/o actividad de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, glutatión peroxidasa).

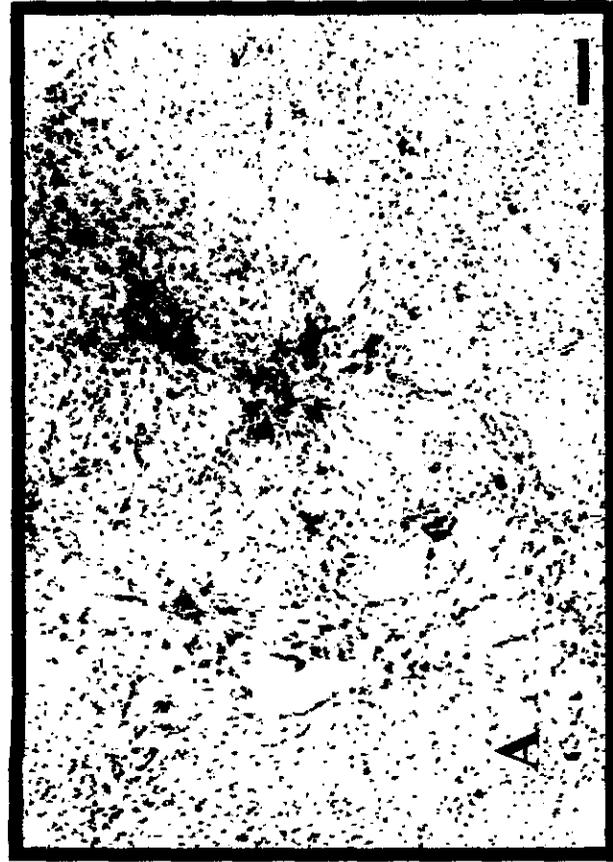


Fig. 7. Fotomicrografías de células cromafines de ratas J cocultivadas con neuronas estriatales tratadas a distintas concentraciones de L-DOPA. a) control; b) 100 μ M; c) 200 μ M; d) 300 μ M. Las células cromafines (TH+) se observan de color oscuro. Contraintención de núcleos con hematoxilina. Amplificación X40. Barra=100 μ m.

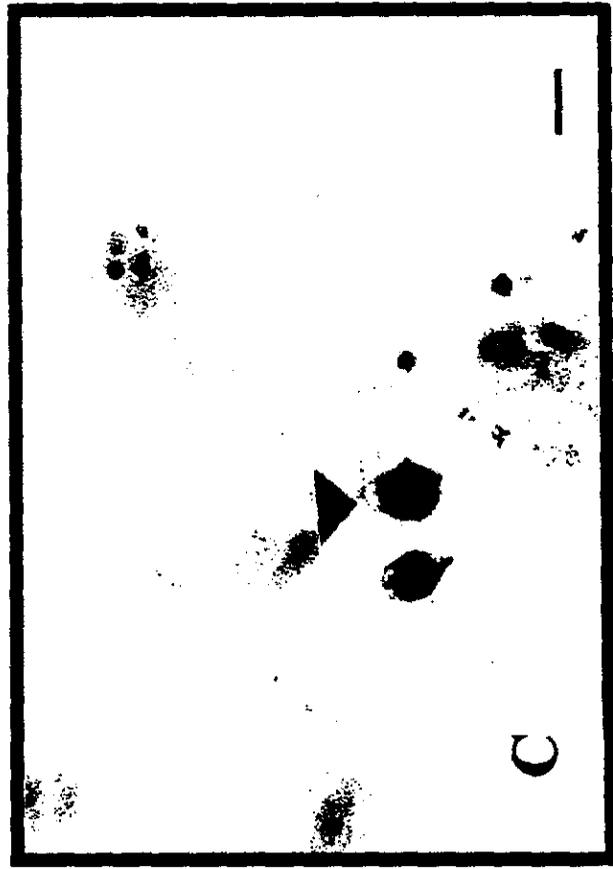
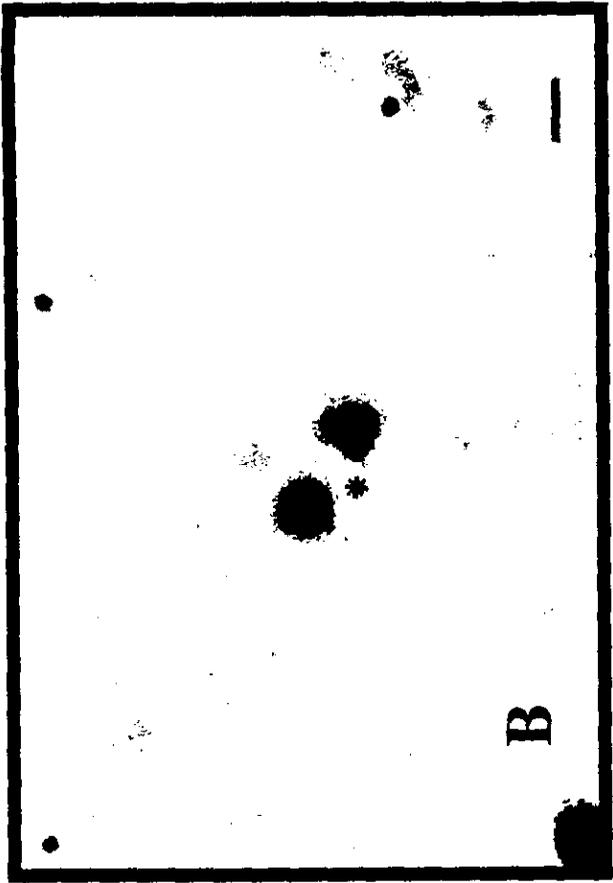
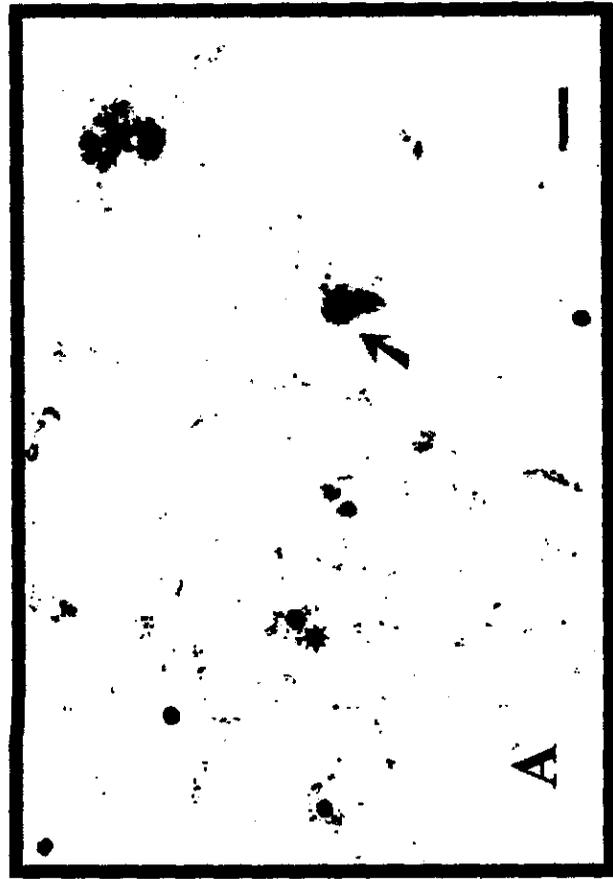


Fig. 8. Fotomicrografías que muestran el daño celular a $300\mu\text{M}$ de L-DOPA. a) células cromafines normales (flechas) y fragmentaciones nucleares (estrellas); b) expulsión de núcleos (asterisco); c) vacuolización celular (cabeza de flecha); d) las distintas etapas del daño celular. Amplificación a: X200, barra= $20\mu\text{m}$; b, c, d X400, barra= $10\mu\text{m}$.

De manera similar, la disminución de la densidad celular conforme se incrementa la concentración de L-DOPA, se explica por la ascendente aplicación de la concentración de L-DOPA que se degrada y por lo tanto, se forman mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno, superando cualquier mecanismo antioxidante de las células.

Si tomamos en cuenta la densidad celular en cocultivos sin L-DOPA por la técnica de TH+, se encuentra un número de células cromafines mayor en RN que en juveniles, lo que indica una mayor plasticidad de las primeras, probablemente sea porque se adaptan y sobreviven mejor en las nuevas condiciones microambientales en los cocultivos con neuronas estriatales.

De igual manera, en cocultivos analizados con la técnica de azul tripano, se observa que hay una disminución en la densidad general de RN a juveniles, ambos sin tratamiento (controles), pero debido a que la técnica no distingue entre los linajes celulares involucrados en el cocultivo, no se puede atribuir esta disminución a un tipo específico de células, sino que esta disminución puede deberse al daño en células gliales y/o neuronas, además del daño sobre las cromafines que ya se ha visto.

Por esta misma razón, el comportamiento de las células juveniles no es el mismo de una técnica a otra (figs. 6b y 10), es decir, las células cromafines muestran alta sensibilidad a concentraciones mayores a 100 μ M de L-DOPA (fig. 6b), pero en la densidad de todos los tipos celulares involucrados (fig. 10), el efecto de la L-DOPA es

más bien gradual, requiriendo concentraciones mayores a 200 μM para provocar daño a la mitad de la población.

CONCLUSIONES FINALES

De lo observado anteriormente, surgen dos hechos relevantes:

- 1- La administración de L-DOPA en los cocultivos disminuye la densidad y la viabilidad de células cromafines. Estos resultados tienen estrecha relación con los observados en cultivos de células mesencefálicas (Mena 1993, Rajput 1997) a los que se les administró L-DOPA. Este daño a las células se ha atribuido a la producción de radicales libres y la consecuente peroxidación lipídica.
- 2- Los aspectos del daño celular causado por la L-DOPA sugieren que se está desencadenando un proceso de muerte celular apoptótica (fragmentación nuclear, condensación de cromatina, expulsión de núcleos).

Finalmente, los resultados obtenidos abren toda una gama de discusiones para investigar : daño a las membranas celulares, producción de radicales libres, quinonas y semiquinonas, niveles de antioxidantes, caracterización del daño apoptótico y transcripción de genes durante la apoptosis.

Los resultados del presente estudio integral serán clínicamente relevantes, ya que en pacientes con EP sometidos a trasplante de médula suprarrenal, se carece de protección en este aspecto. Los antioxidantes adecuados podrían reducir la vulnerabilidad de las células cromafines transplantadas.

VII. REFERENCIAS

Alberts, B. ; Bray, D. ; Lewis J. ; Raff M. ; Roberts, K. ; Watson J. D., 1994, Differentiated cells and the maintenance of tissues. In : Molecular Biology of The Cell. 3rd ed. Garland Publishing, Inc, N. y. & London: 1139-1193.

Anglade, P., Hirsch, E. C., Brandel, J. P., Javoy-Agid, F., Duyckaerts, C., Hauw, J. J. and Agid Y., 1993, Adrenal transplant, dopaminergic neurons and Parkinson's disease. Ann. Neurol 33 :662-663.

Berkow, R. y Flecher, A. J., 1992, Trastornos del movimiento : trastornos exptiramidial y cerebelosos. En : El Manual Merck, 16^a edición, Oceano-Centrum.

Black, V. A. The adrenal gland. In L, Weiss (Editor), 1992, Cell and Tissue Biology, A Text book of Histology. Urban and Schwarzhangberg, 6th edition, pp. 1037-1065.

Chalmers, G.R.; Fisher, L.J.; Nijima, K.; Patterson, P.H.; Gage, F.H., 1995, Adrenal chromaffin cells transdifferentiate in response to basic fibroblast growth factor and show directed outgrowth to a nerve growth factor source *in vivo*. Exp. Neurol. 133: 32-42, 1995.

Cheng, N., Maeda, T., Kume, T., Kaneko, S., Kochiyama, H., Akaike, A., Goshima, Y. and Y. Misu, 1996, Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons, Brain Res 743: 278-283.

Freed, W.J., Poltorak, M., and Becker, J.B., 1990, Intracerebral adrenal medulla grafts: A review. Experimental Neurology, 110: 139-166.

Gerlach, M. and Riederer P., 1996, Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* 103 : 987-1041.

Granham, D. G., 1978, Oxidative pathways for catecholamine in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharm.* 14 : 633-643.

Islas-Suárez, L., Gómez-Chavarín, M., Drucker-Colín, R., and Hernández-Cruz, A. (1994), *J. Neurophysiol.* 72, 1938-1948.

Kurlan, R., 1995, Treatment of movement disorders. Lippincott company, Philadelphia.

Lindvall, O., 1991, Prospects of transplantation in human neurodegenerative disease. *TINS* 14 : 376-384.

Madrazo, I., Drucker-Colín R., 1987, Open microsurgical autograft of adenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's Disease. *New England J. Med.* 316 : 831-834.

McGahon, A. J., Martin S. J., Bissonnette R. P., 1995, The end of cell line : Methods for the study of apoptosis in vitro. In : *Methods in Cell Biology*, vol. 46, Cell Death. (Schwartz L. M., Osborne B. A., Ed.). Academic Press, San Diego.

Mena, M. A., Pardo B., Paino C. L. and García de Yebenes J., 1993, Levodopa toxicity in foetal rat midbrain neurones in culture : modulation by ascorbic acid. *NeuroReport* 4 : 438-440.

Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method.* 65 : 55-63.

Mytilineou, C., Han, S. and G. Cohen, 1993, Toxic and protective effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures, *J Neurochem* 61 : 1470 -1478.

Olson, L., Seiger, A., Freedman, R., and Hoffer, B., 1980, Chromaffin cells can innervate brain tissue: Evidence from intraocular double grafts. *Experimental Neurology*, 70: 414-426.

Olanow, C. W., Kordower, J. H. and Freeman T. B., 1996, Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *TINS*, 19: 102-109.

Pardo, B., Mena, M.A., Casajeros, M.J., Paíno, C.L. and De Yébenes J., 1995, Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures : protection with antioxidants, *Brain Res* 682:133-143.

Pichardo, Mauro y Passi Siro, 1997, Free Radicals. In *Skin Immune System (SIS)*, Bos J. D., Ed. 2nd edition, CRC Press Boca Raton, New York, pp 207-226.

Rajput, A.H., Fenton, M.E., Birdi, S. and R. Macaulay, 1997, Is levodopa toxic to human substantia nigra?, *Mov Disord* 5: 634-638.

Smith, T. S., Parker, W. D. Jr. and James P. Bennett, Jr., 1994, L-DOPA increases nigral production of hydroxyl radicals *in vitro* : potential L-DOPA toxicity. *NeuroReport* 5 : 1009-1011.

Unsicker, K., 1993, Adrenal chromaffin cells: Paradigma in neural growth factor and development cell biology. *J Anat* 183: 207-221

Zhang, Limei, Ma. Estela Ávila, Aleph Alejandro Corona y Alfonso Escobar, 1996, Differentiation enhancement of rat chromaffin cells into neuronal phenotype by co-culturing with caudate nucleus neurons. XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Puebla, Puebla. Resumen C15.

Zhang, L., Zhou, L., Vega-González, A., Mendoza, D. and Drucker-Colín, R., 1997, ELF magnetic fields promote neurite varicosity formation and cell excitability in cultured chromaffin cells. *Comp. Biochem. Physiol.* C118 (3) : 295-299.

Zhang, L., Castell, A., Ávila, M.E., Drucker-Colín R. and Escobar, A., 1998, Immunocytochemical, ultrastructural and neurochemical evidences on synaptogenesis and dopamine release of rat chromaffin cells co-cultured with atrial neurons. *Brain Res. Bull.* (en revisión).

VIII. APÉNDICE

Solución Spinner sin calcio

- 1) Agregar 1 ml de HEPES 1M/100 ml SSS.
- 2) Se agrega 1 mg/ml de BSA.
- 3) Se añade 1 ml/100 ml SSS de antibiótico estreptomycin-penicilina.
- 4) Se filtra y vacía en un frasco estéril.

Medio de cultivo

- 1) Se colocan 100 ml de medio DMEM.
- 2) Se agrega HEPES 1 ml 1M.
- 3) Se añade 1 ml de antibiótico.
- 4) Finalmente se agrega 4.5 µg/ml de insulina.

Tratamiento para adhesión celular

- 1) Se prepara la solución con poli-L-lisina: 100 µg/ml de agua estéril.
- 2) Se cubre la superficie de cultivo con dicha solución por 10 minutos.
- 3) Se aspira la solución y se lava tres veces con agua estéril.

PBS

Na₂HPO₄ ----- 1.48 g

KH₂PO₄ ----- 0.43 g

Corona A. A. Toxicidad de la L-DOPA sobre células cromafines transdiferenciadas.1998

NaCl ----- 7 g

Se afora a un litro de agua y se ajusta a pH 7.4.

PBS-albúmina-tween

PBS ----- 1000 ml

Albúmina ----- 1.0 g

Tween ----- 0.1 ml