



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Trasplante de Neuronas y Células Gliales de la *Sustancia Nigra* de Animales Sanos a un Modelo en Rata Wistar de la Enfermedad de Parkinson.

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

PRESENTADO POR:

Biol. Exp. Deisy Hernández Zúñiga

Director: Dr. Mario García Lorenzana

Asesores: Dra. Anabel Jiménez Anguiano.

Dr. Rafael Godínez Fernández

México, D.F. Diciembre del 2013

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. La alumna Deisy Hernández Zúñiga recibió apoyo de CONACyT, bajo el número de becario 26578 con el CVU 420480.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Trasplante de neuronas y células gliales de la *Sustancia Nigra* de animales sanos a un modelo en rata Wistar de la enfermedad de Parkinson presentado por: B.E. Deisy Hernández Zúñiga. Con fecha 10 de diciembre del 2013”.

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

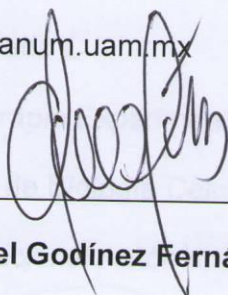
Profesor titular C

Lab. Neuroquímica del Sueño

Depto. de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa

Correo: aja@xanum.uam.mx



Dr. José Rafael Godínez Fernández

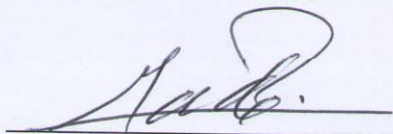
Profesor titular C

Lab. Biofísica

Depto. de Ingeniería Eléctrica.

Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa

Correo: rgodinezfer@gmail.com



Dra. Nohra Elsy Beltrán Vargas

Profesor Titular C

Departamento de Procesos y Tecnología

Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa

nbeltran@correo.cua.uam.mx



Dr. Miguel Ángel Herrera Enríquez

Profesor Asociado C

Lab. Inmunoterapia Experimental

Departamento de Biología Celular y Tisular

Universidad Nacional Autónoma de México





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 09/12/2013
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna DEISY HERNANDEZ ZUÑIGA, matrícula 2113801346, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha diez de diciembre del 2013 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

TRASPLANTE DE NEURONAS Y CELULAS GLIALES DE LA SUSTANCIA NIGRA DE ANIMALES SANOS A UN MODELO EN RATA WISTAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobado.

JURADO

Presidenta

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

Secretario

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

Vocal

DRA. NOHRA ELSY BELTRAN VARGAS

Vocal

DR. MIGUEL ANGEL HERRERA ENRIQUEZ

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000, Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

iv

Comité Tutorial

Director

Dr. Mario García Lorenzana

Profesor titular C

Lab. Neurobiología Tisular

Depto. de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa

Correo: mglo@xanum.uam.mx

Asesores

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Profesor titular C

Lab. Neuroquímica del Sueño

Depto. de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa

Correo: aja@xanum.uam.mx

Dr. José Rafael Godínez Fernández

Profesor titular C

Lab. Biofísica

Depto. de Ingeniería Eléctrica.

Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa

Correo: rgodinezfer@gmail.com

Este trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Se desarrolló en los siguientes laboratorios: el laboratorio de Neurobiología Tisular y Neuroquímica del Sueño del Área de Neurociencias, pertenecientes al departamento de Biología de la Reproducción, bajo la dirección de los Dres. Mario García Lorenzana y Anabel Jiménez Anguiano respectivamente; y el laboratorio de Biofísica del Área de Ingeniería Biomédica del departamento de Ingeniería Eléctrica, bajo la dirección del Dr. Rafael Godínez Fernández. La alumna Deisy Hernández Zúñiga recibió apoyo de CONACyT, bajo el número de becario 26578 con el CVU 420480.

DEDICATORIA

A mis padres

Les agradezco infinitamente todo lo que me han dado: la vida, el amor y el dinero.

Gracias por permitirme seguir con mis sueños y por estar conmigo en todo momento.

A mis hermanos

Son una parte muy importante en mi vida al igual que mis padres les agradezco por su compañía y comprensión, los momentos más dichosos de mi vida los he tenido a su lado.

A mis abuelos

Que grandes enseñanzas me han dejado, por su valentía, responsabilidad y determinación que tienen para cada una de sus actividades cotidianas y por su amor incondicional.

A mis amigos

Gracias por su ayuda incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero externar mis agradecimientos a las siguientes personas:

Ing. Biomédicos Rafael Hernández Castillo y Paulina Hernández Garces por proporcionar las células utilizadas en el presente trabajo.

Dr. José Rafael Godínez Fernández por el préstamo de su laboratorio y su asesoría.

Dra. Anabel Jiménez Anguiano por el préstamo de su material, asesoría y terapias psicológicas.

Dr. Mario García Lorenzana por el préstamo de su material y laboratorio, paciencia y su ejemplo de vida.

B. E. Mario Teteltitla Silvestre y Alejandro Domínguez Campuzano por el préstamo de material y de laboratorio.

Abreviaturas

AD	Alzheimer Disease	Enfermedad de Alzheimer
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis	Esclerosis Lateral Amiotrófica
AP	Anteroposterior	Anteroposterior
AP	Parkinson Disease	Enfermedad de Parkinson
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	Factor de Crecimiento Derivado de Cerebro
DA	Dopamine	Dopamina
DAT	Dopamine Transporter	Transportador de Dopamina
DV	Dorsoventral	Dorsoventral
FGF	Fibroblast Growth Factors	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
GDNF	Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor	Factor Derivado de Células Gliales
IGF1	Insulin-Like Growth Factor 1	Factor de Crecimiento Insulinico tipo 1
MFB	Medial Forebrain Bundle	Haz Medial del Cerebro Anterior
ND	Neurodegenerative Disease	Enfermedades neurodegenerativas
NGF	Nerve Growth Factor	Factor de crecimiento Nervioso
NSC	Neural Stem Cell	Células Madre Neuronales
OH·	Hydroxyl radical	Radicales hidroxilo
ROS	Reactive Oxygen Species	Especies Reactivas de Oxígeno
SN	Substantia Nigra	Sustancia Nigra
SNC	Substantia Nigra Pars Compacta	Sustancia Nigra Pars Compacta
ST	Striatum	Estriado
T	Thalamus	Tálamo
TGF	Transforming Growth Factor Beta	Factor de Crecimiento Transformante
TH	Tyrosine Hydroxylase	Tirosina Hidroxilasa
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VTA	Ventral Tegmental Area	Area Tegmental Ventral

Trasplante de Neuronas y Células Gliales de la *Sustancia Nigra* de Animales Sanos a un Modelo en Rata Wistar de la Enfermedad de Parkinson.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y es el desorden de movimiento más frecuente, está caracterizada por el déficit de dopamina. La falta de dopamina se debe a la muerte de neuronas dopaminérgicas principalmente en la *sustancia nigra*. La PD es progresiva y no tiene cura, el tratamiento farmacológico no detiene el progreso de la enfermedad sólo disminuye los síntomas clínicos. La terapia celular es una alternativa terapéutica que tiene como propósito detener la progresión de la enfermedad restituyendo a la población de células perdidas por nuevas, y ha sido utilizada desde los años 80's para tratar la PD. Tanto en ensayos clínicos en pacientes con PD en etapas avanzadas como en modelos animales de la PD se han utilizado implantes de neuronas como la principal fuente celular y estos han mostrado una mejoría de los síntomas motores con distinto grado de recuperación.

Recientemente se han desarrollado algunos protocolos de trasplante en los que se han utilizado otros tipos celulares pertenecientes a las células gliales ya que juegan un importante papel en la regulación funcional de las neuronas, actualmente no hay trabajos que reporten el efecto del trasplante de neuronas y células gliales a un modelo de la PD. Este trabajo propone evaluar el trasplante de neuronas y células gliales obtenidos de ratas adultas sanas a un modelo en rata Wistar de la PD. Se

utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 g. Se realizó el modelo de la PD (n=15) utilizando a la neurotoxina 6-OHDA administrada por cirugía estereotáxica de forma unilateral, posteriormente se evaluó la conducta motora a través de las tres pruebas siguientes: elevación corporal, cilindro y campo abierto. Cuatro semanas después, los animales lesionados recibieron el trasplante de neuronas y células gliales (n=10) dentro del área lesionada previamente y durante las 2 semanas posteriores se hizo la evaluación de la conducta motora, utilizando las pruebas anteriormente mencionadas. Finalmente los animales fueron sacrificados y fijados por riego intravascular con paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron procesados para microscopía de luz y las tinciones empleadas fueron: Hematoxilina-Eosina y Kluver- Barrera, el material se analizó con un microscopio Axioskop 2 adaptado a una cámara AxioCamMRc5 y software Axiovision 4.8.

Los resultados sugieren la supervivencia de las células trasplantadas obtenidas de ratas adultas sanas y la mejoría conductual del modelo animal de la PD, por lo tanto el trasplante de neuronas y células gliales puede ser una alternativa terapéutica prometedora.

Abstract

Parkinson 's disease is the second most common neurodegenerative disorder and is the most common movement disorder , is characterized by a deficiency of dopamine. The lack of dopamine is due to death of dopaminergic neurons in the substantia nigra mainly. Parkinson 's disease is progressive and has no cure, no drug treatment stops the progression of the disease only reduces clinical symptoms. Cell therapy is an

alternative therapy that aims to halt the progression of the disease restituyendo the population loss by new cells, and has been used since the 80's to treat Parkinson's disease. Both in clinical trials in patients with Parkinson's disease in advanced stages and in animal models of Parkinson's disease have been used as implants neurons major cellular source and these have shown improvement of motor symptoms with varying degrees of recovery.

Recently developed some transplant protocols that have been used in other cell types belonging to the glial cells and that play an important role in functional regulation of neurons, there is currently no work to report the effect of transplantation of neurons and cells glial to a model of PD. This work aims to evaluate the transplantation of neurons and glial cells obtained from healthy adult rats to a Wistar rat model of Parkinson's disease. Male Wistar rats of 250 to 300 g were used. Model of Parkinson's disease (n=15) using the neurotoxin 6-OHDA administered unilateral stereotaxic surgery was performed, then the motor behavior through the following three tests were evaluated: body lifting cylinder and open field. Four weeks later animals received transplants injured neurons and glial cells (n = 10) within the previously injured area and during 2 weeks after the assessment was made motor activity using the above tests. Finally the animals were sacrificed and fixed by intravascular irrigation with 4% paraformaldehyde. The brains were processed for light microscopy and staining were used: hematoxylin-eosin and Kluver-Barrera, the material was analyzed with an microscope Axioskop 2 adapted to a camera and Axiovision 4.8 AxioCamMRc5 software.

The results suggest the survival of transplanted cells obtained from healthy adult rats and behavioral improvement of the animal model of Parkinson's disease , therefore transplantation of neurons and glial cells could be a promising therapeutic alternative

Trasplante de Neuronas y Células Gliales de *la Sustancia Nigra* de Animales Sanos a un Modelo en Rata Wistar de la Enfermedad de Parkinson.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	2
2	ANTECEDENTES.....	4
2.1	SISTEMA NERVIOSO	4
2.2	TIPOS CELULARES DEL TEJIDO NERVIOSO.....	5
2.3	ZONAS DEL SISTEMA NERVIOSO INVOLUCRADAS EN LA GENERACIÓN DE MOVIMIENTOS	10
2.4	ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	12
2.5	ENFERMEDAD DE PARKINSON (PD).....	13
2.6	CUERPOS DE LEWY EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	14
2.7	LA PROTEÍNA A-SINUCLEÍNA	15
2.8	MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	16
2.9	TERAPIAS PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	19
3	JUSTIFICACIÓN	23
4	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
5	HIPÓTESIS.....	25
6	OBJETIVO GENERAL.....	25
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
8	MATERIAL Y MÉTODO	26
8.1	GRUPOS EXPERIMENTALES.....	26
8.2	MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA WISTAR (CIRUGÍA DE LESIÓN)	29
8.3	EVALUACIÓN CONDUCTUAL	30
8.4	OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE RATAS ADULTAS SANAS	32

8.5	CUANTIFICACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR.....	33
8.6	CIRUGÍA DE TRASPLANTE.....	33
8.7	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS	34
8.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	34
9	RESULTADOS.....	35
9.1	ESTANDARIZACIÓN DE LA ZONA DE LESIÓN.....	35
9.2	CUANTIFICACIÓN CELULAR Y VIABILIDAD CELULAR DE LA SUSPENSIÓN CELULAR A TRASPLANTAR.....	36
9.3	EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA MOTORA DESPUÉS DE LA LESIÓN CON 6-OHDA EN LA SUSTANCIA NIGRA Y DEL TRASPLANTE DE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES.	38
9.4	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DEL MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON DURANTE 8 SEMANAS	42
9.5	SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS DESPUÉS DE DOS SEMANAS DEL TRASPLANTE.....	45
10	DISCUSIÓN.....	53
11	CONCLUSIONES.....	66
12	PROSPECTIVAS.....	67
13	REFERENCIAS	68
13.1	PÁGINAS WEB.....	75
14	ANEXOS.....	77
14.1	ANEXOS DE LA METODOLOGÍA.....	77
14.2	ANEXOS DE LOS RESULTADOS.....	84

Lista de figuras

FIG. 1.	NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES DE LA <i>SUSTANCIA NIGRA</i>	6
FIG. 2.	CUERPO DE LEWY.....	14
FIG. 3.	ESQUEMA DE LAS FASES DE INICIO Y PROGRESIÓN DE LA PD.	15
FIG. 4.	<i>SUSTANCIA NIGRA</i> DE RATA LESIONADA CON 6-OHDA.	17
FIG. 5.	DIAGRAMA DEL MÉTODO.....	30
FIG. 6.	ZONA DE LESIÓN.	35
FIG. 7.	ZONA DE LESIÓN Y DEPÓSITO DE COLORANTE.....	36
FIG. 8.	EFFECTO DE LA LESIÓN EN LA <i>SUSTANCIA NIGRA</i> CON 6-OHDA Y DEL TRASPLANTE DE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES SOBRE LA ELEVACIÓN CORPORAL DE LA RATA.	39
FIG. 9.	EFFECTO DE LA LESIÓN EN LA <i>SUSTANCIA NIGRA</i> CON 6-OHDA Y DEL TRASPLANTE DE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES SOBRE LA ELEVACIÓN CORPORAL DE LA RATA.	40
FIG. 10.	EFFECTO DE LA LESIÓN EN LA <i>SUSTANCIA NIGRA</i> CON LA NEUROTOXINA 6-OHDA Y DEL TRASPLANTE DE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES SOBRE EL COMPORTAMIENTO MOTOR.....	41
FIG. 11.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DURANTE 8 SEMANAS DEL MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	43
FIG. 12.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DURANTE 8 SEMANAS DEL MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	44
FIG. 13.	CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS EN EL MODELO DE LA EP.....	46
FIG. 14.	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS SUPERVIVIENTES EN LA <i>SUSTANCIA NIGRA</i> DEL MODELO DE LA EP	47
FIG. 15.	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS SUPERVIVIENTES EN EL TÁLAMO DEL MODELO DE LA EP	48

FIG. 16.	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS SUPERVIVIENTES EN EL CUERPO ESTRIADO DEL MODELO DE LA EP	49
FIG. 17.	FOTOMICROGRAFÍAS DE LA <i>SUSTANCIA NIGRA</i>	50
FIG. 18.	FOTOMICROGRAFÍAS DEL TÁLAMO.....	51
FIG. 19.	FOTOMICROGRAFÍAS DE CUERPO ESTRIADO.....	52
FIG. 20.	PRUEBA DE ELEVACIÓN CORPORAL.....	77
FIG. 21.	PRUEBA DE ELEVACIÓN CORPORAL.....	78
FIG. 22.	CAMPO ABIERTO.....	78
FIG. 23.	<i>HEMOCITÓMETRO</i>	79

1 Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas (ND) suponen junto con las enfermedades vasculares y oncológicas, las principales causas de mortalidad y morbilidad. Las ND se caracterizan por la pérdida progresiva de cierto grupo de neuronas. La posibilidad de padecer alguna de las ND se incrementa con la edad. Actualmente en México hay alrededor de 112 millones de habitantes con una edad media de 26 años (INEGI, 2010), y de estos, sólo 4 millones son mayores de 60 años, sin embargo, se calcula que para el año 2050 habrá 36 millones de personas por arriba de los 60 años, por lo que, el número de casos con ND conforme pasa el tiempo ira incrementando (Guevara, 2010).

Una de las clasificaciones de las ND se hace en función de las manifestaciones clínicas que presentan, por ejemplo: la enfermedad de Alzheimer (AD) que presenta síndromes demenciales; la enfermedad de Parkinson (PD) está relacionada fundamentalmente con trastornos del movimiento y la postura; y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) que presenta síntomas de debilidad y atrofia muscular (Segura *et al.*, 2003).

La EP se produce por una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* (SN) y ganglios basales; representa la segunda ND más común, las personas que padecen la PD tienen una edad media de inicio de 55 años, pero generalmente, cuando ocurre el diagnóstico de la enfermedad la degeneración neuronal se encuentra ya muy avanzada (Brundin *et al.*, 2008). La terapia farmacológica actual se basa en la administración de L-DOPA, fármaco que alivia los

síntomas en etapas tempranas de la PD, pero, que resulta insuficiente para etapas tardías. Hay nuevas metodologías terapéuticas no farmacológicas para PD, que consisten en la renovación celular y el establecimiento de nuevas uniones celulares (Isacson *et al.*, 2003), las cuales, se basan en el trasplante de células madre neuronales (NSC) adultas y embrionarias. Las neuronas trasplantadas sustituyen a las neuronas muertas y restablecen la neurotransmisión dopaminérgica (Brundin *et al.*, 2008). Los resultados de trasplantes celulares son polémicos, ya que por un lado muestran una mejoría de la sintomatología característica de la PD posterior al trasplante, y por otro lado, resultados revelan que en algunas ocasiones en los sitios de trasplantes se presenta la formación de tumores, debido a una inadecuada diferenciación de células embrionarias a neuronas dopaminérgicas (Bjorklund, 2004; Fukuda *et al.*, 2006; Muraoka *et al.*, 2008, Ko *et al.*, 2009; Ben-David and Benvenisty, 2011).

En paralelo con el desarrollo del trasplante neuronal, el trasplante de células gliales ha evolucionado rápidamente (Franklin *et al.*, 2012), la idea del trasplante de células gliales se basa en el conocimiento que se tiene sobre el papel de las células gliales como soporte estructural y metabólico de las neuronas para su adecuada función y sobrevivencia (Schapira, 2009; Halliday *et al.*, 2011). Trabajos en modelos de la AD y de lesiones en la médula espinal, muestran la sobrevivencia de las células trasplantadas (neuronas y células gliales), la migración de estas células al sitio de daño, y hasta una recuperación funcional en los animales que recibieron el trasplante (Lee *et al.*, 2005; Xuan *et al.*, 2009; Lepore *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2012; CSTMN,

2012). Los trasplantes de células gliales, al igual que la mayoría de los de neuronas se han basado en el uso de células madre precursoras gliales embrionarias como fuente celular, por lo que sigue existiendo el riesgo de una inadecuada diferenciación, incapacidad funcional o hasta la formación de neoplasias.

Actualmente no hay estudios sobre el trasplante de neuronas y células gliales obtenidas de ratas adultas sanas a un modelo de la PD, evitando el uso de células precursoras neuronales y gliales y con ello el riesgo de formación de neoplasias.

2 Antecedentes

2.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso es uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano y tiene una importancia decisiva en el control de las funciones corporales y de generar respuestas rápidas a una amplia variedad de estímulos. El sistema nervioso es el responsable de que las personas podamos recordar, memorizar, aprender, de nuestras conductas y emociones, de cómo percibimos a nuestro ambiente, a través de los sentidos y del movimiento. El movimiento no es sólo una forma de transportar a nuestro cuerpo, sino también, el mantenimiento del equilibrio, la postura, y el movimiento como una forma de comunicación (Kandel *et al.*, 2000; Kiernan, 2009). En los seres humanos la planificación y la ejecución de los movimientos han alcanzado un nivel alto de precisión y originalidad. Por ejemplo: tan solo para mantener la postura, el cuerpo humano debe sincronizar la contracción y relajación

de unos 600 músculos que mueven un esqueleto de más de 200 huesos (Pérez *et al.*, 2007).

El sistema nervioso está constituido por un conjunto de órganos y estructuras que trabajan de forma coordinada, de manera que se mantiene a todo el cuerpo comunicado (Pérez *et al.*, 2007). Se compone del encéfalo (que contiene al cerebro), nervios craneales y sus ramas, médula espinal, nervios raquídeos y sus ramas, ganglios, plexos entéricos y receptores sensoriales (Kandel *et al.*, 2000).

El cerebro es el órgano principal del sistema nervioso (Pérez *et al.*, 2007), es el centro que procesa toda la información sensorial, controla y coordina los movimientos y el comportamiento generando así respuestas a los estímulos tanto internos como externos (Kandel *et al.*, 2000).

2.2 Tipos celulares del tejido nervioso

El tejido nervioso está constituido por dos grandes variedades celulares las neuronas y las células de la glía (véase Fig. 1) o conocidas también como neuroglía. Se estima que un cerebro humano que tiene de 50-70 años contiene 86 billones de neuronas, con respecto, a la cantidad de células gliales, anteriormente se creía superaban de 5-10 veces a la población neuronal actualmente se ha determinado que la proporción neurona-glía es 1:1 (Lent *et al.*, 2012). La cantidad de neuronas y células gliales varían de acuerdo a la región anatómica del cerebro (Chadi *et al.*, 2009).

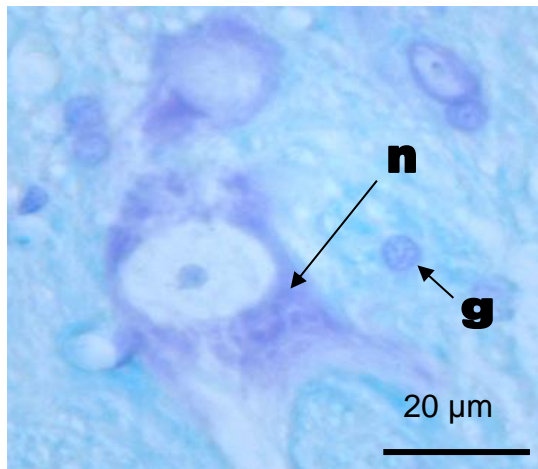


Fig. 1. Neuronas y células gliales de la sustancia nigra.

Corte coronal de la *sustancia nigra* de rata control teñido con Kluver-Barrera, la cual se caracteriza por tener neuronas con un gran núcleo y un nucléolo definido con un soma que mide aproximadamente 20 μm y las células gliales de un menor tamaño. Abreviaturas: n= neurona y g= célula glial.

Las neuronas poseen un cuerpo celular conocido como soma o pericarion, compuesto

por un núcleo rodeado de cantidades variables de citoplasma, cuentan dependiendo de su localización y función distintas cantidades de proyecciones citoplásmicas, las cuales se clasifican como: dendritas que son aquellas proyecciones que conducen impulsos nerviosos de manera aferente y se caracterizan por ser delgadas y altamente ramificadas y una única proyección gruesa y poco ramificada conocida como axón el cuál conduce impulsos de manera eferente. Las neuronas pueden clasificarse según la cantidad de prolongaciones en unipolares, pseudounipolares, bipolares y multipolares. Según la longitud del axón las neuronas se pueden clasificar en neuronas de proyección (Golgi tipo I) e interneuronas (Golgi tipo II) (Finn-Geneser, 2000).

Las neuronas generan potenciales de acción o impulsos nerviosos en respuesta a estímulos, una vez que ocurren estos se propagan de una neurona a otra o hacia una célula efectora a través de la sinapsis. Las neuronas liberan neurotransmisores en las terminales presinápticas, los cuáles, al unirse con su receptor en la membrana de una neurona postsináptica producen potenciales

postsinápticos excitatorios o inhibitorios; la suma algebraica de estos en segmento inicial y en el soma determinan si la neurona postsináptica disparará un potencial de acción continuando la propagación del impulso nervioso (Finn-Geneser, 2000).

Algunos ejemplos de neurotransmisores son las catecolaminas (compuestos formados de un grupo benceno, dos hidroxilos y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados). Las catecolaminas dopamina (DA), adrenalina y noradrenalina actúan como mensajeros químicos en el sistema nervioso de los mamíferos. La DA es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del sistema nervioso central (Trujillo *et al.*, 2000), tiene muchas funciones en el cerebro, incluyendo papeles importantes en el comportamiento y la cognición, la actividad motora, la motivación y la recompensa, el sueño, el humor, la atención, el aprendizaje y la ingesta de alimentos y agua (Kandel *et al.*, 2000).

La historia sobre la investigación de la glía comienza en 1846 cuando Virchow la describió como una especie de cemento al que nombró como neuroglía, pensando que eran elementos estáticos sin una función relevante. En los últimos años ha incrementado exponencialmente la investigación sobre las células de la glía (Matyash and Kettenmann., 2010; García-Marín *et al.*, 2007). Actualmente se sabe que las células de la glía se caracterizan por proporcionar un sostén estructural a las neuronas, además, participan en varias funciones, en la etapa del desarrollo embrionario y postnatal (Schapira, 2009; Halliday *et al.*, 2011).

Las células de la glía se pueden clasificar por su morfología en dos tipos: la macroglía y microglía (Matyash and Kettenmann, 2010).

Dentro de la macroglía se encuentran los astrocitos y los oligodendrocitos. Los astrocitos de acuerdo a su morfología se habían dividido clásicamente en dos subtipos: astrocitos protoplásmicos que se encuentran preferentemente en la sustancia gris, envolviendo a los cuerpos celulares y sinapsis, con ramificaciones de gran tamaño; los astrocitos fibrosos ubicados predominantemente en la sustancia blanca envolviendo a los nódulos de Ranvier con ramificaciones moderadas, sin embargo, trabajos recientes discuten una nueva clasificación en base a marcadores moleculares en donde identifican a varios subtipos de astrocitos: muller, tanicitos, células radiales, glía de Bergmann, astrocitos fibrosos, glía marginal, astrocitos protoplásmicos, glía perivascular y glía ependimal (Matyash and Kettenmann, 2010).

Los astrocitos tienen entre sus funciones el promover la formación sináptica, la síntesis y secreción de factores neurotróficos como: Factor Neurotrófico Derivado de las Células Gliales (GDNF), Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), Factor de Crecimiento Transformante (TGF), entre otros (Martin *et al.*, 2012); regulación del medio extracelular controlando la homeostasis de K^+ , H^+ y radicales libres; destoxificación de amonio, regulación de neurotransmisores, mantenimiento estable de los niveles de glutatión (GSH), y supe a las neuronas de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011). Los astrocitos ocupan un dominio anatómico que no sobrepasa o sobrepasa muy poco al de sus vecinas. Los astrocitos están conectados por uniones GAP y forman una especie de microdominios (Christensen *et al.*, 2013).

Los oligodendrocitos fueron inicialmente descritos por Pio Del Rio Ortega en 1928 se dividen en dos subtipos: oligodendrocitos mielínicos que producen mielina y se concentran en la materia blanca y los oligodendrocitos amielínicos que se concentran en la materia gris. Los oligodendrocitos tienen un cuerpo pequeño, son células redondas del que surgen los pocos procesos citoplasmáticos cortos y con escasas ramificaciones. La principal función de los oligodendrocitos es la síntesis de factores neuroprotectores y la formación de la vaina de mielina que envuelve a los axones (Matyash and Kettenmann, 2010; Halliday *et al.*, 2011). Los procesos de los oligodendrocitos producen la vaina de mielina alrededor de los axones centrales, por tal motivo un oligodendrocito puede mielinizar hasta 50 segmentos axonales (Christensen *et al.*, 2013).

Las células de la Microglía tienen como principal función la de actuar como el principal sensor de señales inflamatorias inmunológicas y de daño tisular, además tiene efectos neuroprotectores como: detritos celulares y reparar daños de la mielina (Von *et al.*, 2011). Las células de la microglía pertenecen al linaje de los monocitos/macrófagos residentes del sistema nervioso central. En el cerebro adulto las células de la microglía representan del 5-20% de la población total glial. Las células de la microglía tienen una morfología ameboide con un soma delgado y con pocas proyecciones citoplasmicas delgadas y altamente ramificada. Las células de la microglía se activan cuando un agente extraño invade el cerebro o cuando el cerebro

está lesionado brindando una respuesta mediante la liberación de citocinas (Christensen *et al.*, 2013).

Para un adecuado funcionamiento del tejido nervioso, todas las células se mantienen comunicadas entre ellas por ejemplo: oligodendrocitos-astrocitos, neurona-astrocitos protoplásmicos, etc. Estas comunicaciones permiten que se lleven a cabo procesos muy importantes como el crecimiento celular, la dendritogénesis, procesos inflamatorios, e inclusive la modulación de respuestas a estímulos (Von *et al.*, 2011; Nualart-Martí *et al.*, 2012).

2.3 Zonas del sistema nervioso involucradas en la generación de movimientos

El movimiento es un proceso complejo que requiere de la participación de múltiples zonas del sistema nervioso como lo son: la corteza cerebral, una serie de núcleos conocidos como ganglios basales, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal (Kiernan, 2009).

Los ganglios basales son un conjunto de varios pares de núcleos que se encuentran cerca de la base de cada hemisferio cerebral. Tradicionalmente, los anatomistas designan el cuerpo estriado (ST), el claustró y el cuerpo amigdalino como ganglios basales del telencéfalo. Actualmente el término de ganglios basales se aplica al ST, el núcleo subtalámico (del diencefalo) y la SN (del mesencefalo). El ST está constituido por el putamen, el núcleo caudado y el núcleo accumbens (Kiernan, 2009).

Las funciones mejor conocidas del ST son las que se relacionan con el movimiento. Cuando no se ejecuta ningún movimiento las neuronas del ST están en reposo, mientras que las del globo pálido están activas. Poco antes de iniciarse un movimiento y mientras éste se está activando la situación se invierte (Kiernan, 2009).

El ST recibe fibras aferentes de la corteza cerebral, del tálamo (T) y la SN. Las fibras corticoestriadas (de la corteza al ST) que son excitadoras se originan en la corteza de los cuatro lóbulos, pero especialmente de los lóbulos parietal y frontal. Las fibras tálamoestriales (del T al ST), también excitadoras se originan en los núcleos intralaminares del T y las fibras nigroestriadas (de la SN al ST) que usan DA (Kiernan, 2009).

Los axones que abandonan el ST son estriadopalidales (del ST al globo pálido), estas proyecciones son de tipo inhibitoras (Kiernan, 2009). Las diferentes conexiones de los segmentos interno y externo del globo pálido proporcionan dos rutas o circuitos de neuronas conectadas que tienen efectos opuestos sobre la corteza cerebral. En el circuito directo se inicia con las neuronas del ST que contienen GABA, sustancia P y dinorfina, un incremento de la actividad de estas neuronas desinhibe las neuronas talámicas e incrementa la estimulación de la corteza (Kiernan., 2009; Micheli y Fernández, 2010). En el circuito indirecto que incluye al núcleo subtalámico, participan unas neuronas estriatales que contienen GABA y encefalina, el incremento de la actividad de estas neuronas inhiben al T y se disminuye la estimulación a la corteza. La DA incrementa la actividad de las neuronas talamocorticales y finalmente estas neuronas tienen una acción excitadora

promoviendo así el inicio y ejecución del movimiento (Kiernan, 2009; Micheli y Fernández, 2010).

Cualquier daño o lesión en algunas de estas zonas puede provocar desórdenes de movimiento como el que ocurre en la enfermedad de Parkinson, una enfermedad neurodegenerativa (Kiernan, 2009).

2.4 Enfermedades Neurodegenerativas

Las ND se caracterizan por la pérdida progresiva de cierto grupo de neuronas y el principal factor de riesgo para padecer estas enfermedades es el incremento de la edad. Sin embargo, también hay casos asociados a la herencia, así como a factores de tipo ambiental (Brudin *et al.*, 2008; Alarcón *et al.*, 2010; Breydo *et al.*, 2012; Coskun *et al.*, 2012).

En la actualidad se conocen más de 100 ND, aunque, son difíciles de clasificar en base a las manifestaciones clínicas que presentan, debido a que muchas de estas tienen síntomas clínicos que se solapan, se ha tomado en cuenta para la clasificación la topografía de la lesión, por ejemplo: la enfermedad de Alzheimer (AD) presenta síndromes demenciales por el daño neuronal que tiene en la corteza cerebral; la PD se relaciona con trastornos del movimiento y la postura por el daño presente en la SN; y ALS que presenta síntomas de debilidad y atrofia muscular, sin embargo, en los últimos años se ha desarrollado otro sistema de clasificación en base a las alteraciones genéticas o moleculares que las caracterizan (Segura *et al.*, 2003; Antigüedad *et al.*, 2004).

Dado que las ND causan daños irreversibles provocando el deterioro de procesos como: orientación, juicio, lenguaje, conducta, además de rigidez muscular, entre otros, no sólo se afecta a la persona enferma, sino a la familia y a la sociedad en general (Guevara, 2010).

2.5 Enfermedad de Parkinson (PD)

La PD presenta una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SN como consecuencia se produce una pérdida importante de las comunicaciones celulares y la reducción de los niveles de DA, que provoca principalmente disfunción motora (Bjorklund *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2003; Pawitan, 2011). Esta degeneración no es exclusiva de la *sustancia nigra* pars compacta (SNpc), sino se extiende a varios núcleos del tallo cerebral y a otras áreas del cerebro donde hay neuronas dopaminérgicas (Tieu *et al.*, 2013).

Los cuatro síntomas principales son la rigidez, el temblor, inestabilidad postural y la bradicinesia (lentitud de movimientos). Los síntomas comienzan gradualmente y empeoran con el tiempo (Arias-Carrión, 2008). Algunos casos de la PD presentan trastornos emocionales como (depresión y ansiedad), alteraciones del sueño (insomnio, movimientos periódicos durante el sueño, piernas inquietas y parasomnias), trastornos gastrointestinales (estreñimiento, sialorrea) y deterioro cognitivo (NINDS., 2010). La sintomatología clínica resulta evidente hasta que hay un 50-70% de neuronas afectadas (Blesa *et al.*, 2012). A medida que se vuelven más pronunciados los síntomas, los pacientes pueden tener dificultad para caminar,

hablar o completar otras tareas sencillas e inclusive padecer de parálisis corporal (Arias-Carrión, 2008).

2.6 Cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson

Las neuronas de las regiones cerebrales con PD exhiben una gran cantidad de inclusiones eosinofílicas citoplasmáticas (véase Fig. 2), que presentan un núcleo central más denso y un halo periférico. Estas inclusiones son conocidas como cuerpos de Lewy, cuando estas están presentes en el cuerpo celular, y neuritas de Lewy cuando están presentes en procesos neuronales. Estos cuerpos de inclusión son ricos agregados de α -sinucleína, pero también hay componentes del sistema de ubiquitina-proteosoma y moléculas chaperonas (Brundin *et al.*, 2008; Welchko *et al.*, 2012). La formación de estas inclusiones ocurre durante el transcurso de la enfermedad, y desaparecen cuando las neuronas afectadas mueren, este proceso se ha sugerido tarda 6 meses para completarse (Brundin *et al.*, 2008).

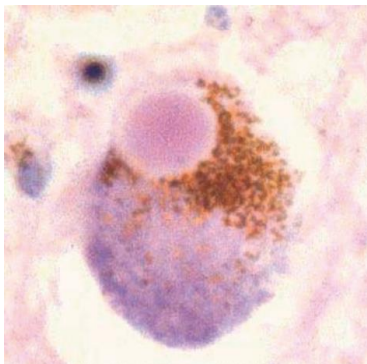


Fig. 2. Cuerpo de Lewy.

El cuerpo de Lewy teñido con hematoxilina-eosina que se muestra como una densa inclusión eosinofílica rodeada por neuromelanina, el producto de la auto-oxidación de la DA (Hartmann, 2004).

2.7 La Proteína α -Sinucleína

La agregación de la proteína α -sinucleína es característica de la PD y la principal proteína encontrada en los cuerpos de Lewy. Es una proteína citosólica, sin embargo, se ha detectado también en la mitocondria; con 140 aminoácidos y está codificada por un solo gen, consiste de 7 exones localizados en el cromosoma 4 (Breydo *et al.*, 2012). En condiciones no patológicas se encuentra en las terminaciones presinápticas y está implicada en el funcionamiento del aparato de Golgi. Durante la PD forma fibrillas insolubles que constituyen a los cuerpos de Lewy. Se considera que el sitio de inicio de la propagación de la patología son los depósitos de α -sinucleína (véase Fig.3) (Halliday *et al.*, 2011; Breydo *et al.*, 2012).

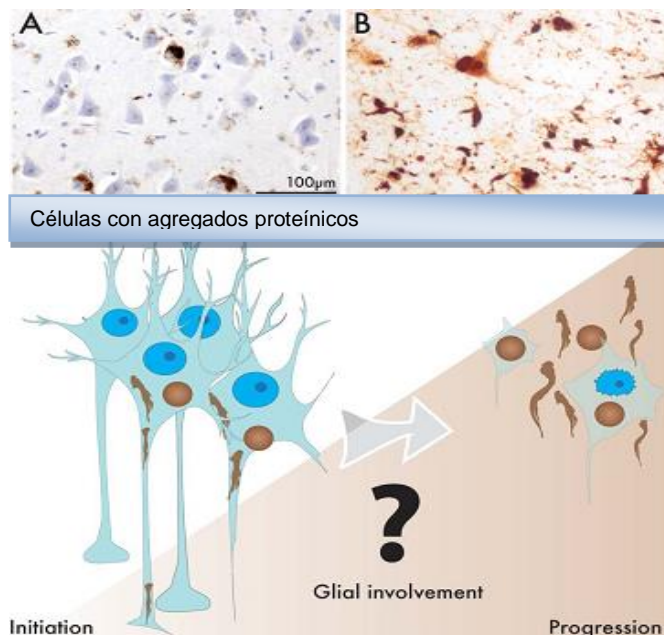


Fig. 3. Esquema de las fases de inicio y progresión de la PD.

Inicialmente hay una gran cantidad de neuronas y se mantienen relativamente sanas pero conforme progresa la PD estas disminuyen, como se muestra en las fotomicrografías: A) teñida con violeta de cresilo de un paciente en una etapa temprana de la enfermedad y B) una zona deteriorada teñida en marrón, de un paciente con una avanzada progresión de la PD (Halliday *et al.*, 2011).

La proteína α -sinucleína también se ha encontrado en otros tipos celulares como: eritrocitos, y en el plasma, adicional a esto se ha encontrado expresada en tumores de mama, ovario y colon rectal (Liu *et al.*, 2011).

2.8 Modelos Animales de la Enfermedad de Parkinson

Cualquier tipo de terapia para la PD se prueba inicialmente en los siguientes modelos animales: ratones, ratas y monos (Tieu *et al.*, 2013). Neurotoxinas como 2,4,5 trihidroxifeniletamina o mejor conocida como 6-Hidroxdopamina (6-OHDA), 1 metil -4 fenil-1,2,3,6 Tetrahidropiridina (MPTP), el herbicida paraquat, y el herbicida y pesticida denominado rotenona, generan modelos de la PD; todos ellos basados en el aumento de la generación de radicales libres en las células, y como consecuencia el incremento de estrés oxidativo, que eventualmente conduce a las neuronas dopaminérgicas a la muerte celular, recreando una característica de la fisiopatología de la PD (véase Fig. 4) (Blesa *et al.*, 2012).

Las neurotoxinas de uso reciente para elaborar el modelo de la PD son la rotenona y paraquat, sin embargo, estas presentan elevadas tasas de mortalidad en los animales debido a su inespecificidad para dañar sólo a las neuronas dopaminérgicas (Jackson-Lewis *et al.*, 2012).

La 6-OHDA y MPTP son las neurotoxinas mas utilizadas, presentan características particulares que las hacen ideales para su utilización en protocolos de investigación, por ejemplo, 6-OHDA necesita ser inyectada en la SN ya que no

atraviesa la barrera hematoencefálica, y ha sido utilizada en varios animales como perros, gatos, ratas y ratones (Tieu *et al.*, 2013); MPTP es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que su vía de administración más frecuente es la sistémica, sin embargo, sólo se ha utilizado en gatos, perros y ratones pero no en ratas, ya que por razones que aún son desconocidas, las ratas no muestran sensibilidad al fármaco (Blesa *et al.*, 2012). La cualidad del MPTP de atravesar la barrera hematoencefálica da a esta neurotoxina la capacidad de lesionar ambos hemisferios, lo que excluye a todas las pruebas de comportamiento basadas en un sesgo lateral y la pérdida celular es dependiente de la cepa, edad, y sexo de la especie (Tieu *et al.*, 2013). En el caso de la 6-OHDA es una neurotoxina que destruye selectivamente las neuronas catecolaminérgicas y se inyecta típicamente de forma unilateral, debido a que su administración bilateral provoca una elevada mortalidad (Iancu *et al.*, 2005).

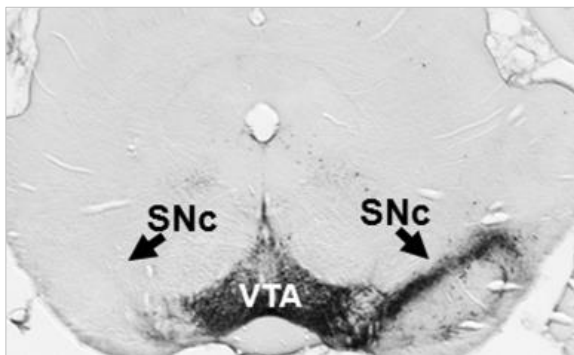


Fig. 4. Sustancia Nigra de rata lesionada con 6-OHDA.

Fotomicrografía que muestra la disminución en la inmunoreactividad de Tirosina Hidroxilasa (TH) en el lado izquierdo lesionado con 6-OHDA en comparación con el lado derecho sin lesionar. Abreviaturas: SNc= Sustancia Nigra Pars Compacta y VTA= Área Tegmental Ventral (Walker *et al.*, 2012).

En la actualidad también hay modelos que utilizan la expresión de mutaciones genéticas en los genes de A-SINUCLEÍNA, PARKIN, LRRK y PINK, sin embargo,

cabe mencionarse que sólo el 10% casos de la PD son por causas genéticas (Hardy *et al.*, 1998; Coskun *et al.*, 2012; Welchko *et al.*, 2012)

Aunque el proceso completo de la PD no es entendido completamente se ha adquirido una mayor comprensión de su etiología, patología y los mecanismos moleculares, gracias a los modelos animales. Sin embargo, una desventaja de los modelos animales es el factor tiempo del modelo vs el de la condición humana, esto debido, a que en pacientes el desarrollo de la enfermedad es un proceso lento, de modo que en el momento de inicio de los síntomas ya han transcurrido varios años de muerte neuronal, el cual se ha calculado varía entre 4-13 años, mientras que, para el caso de la generación del modelo este es un proceso muy rápido de 3-5 semanas; a pesar de esto, no se niega el valor de los estudios realizados en los modelos animales (Bové y Perier, 2012).

Para comprobar el grado de lesión inducido por las neurotoxinas en los modelos animales, y el grado de mejoría establecido por el trasplante de células se realizan pruebas de comportamiento. Existen varias pruebas para evaluar las modificaciones conductuales en modelos animales de PD, sin embargo, son dos las comunmente utilizadas que se basan en la administración de fármacos (Blesa *et al.*, 2012). La prueba de rotación en respuesta a la apomorfina y/o de D-anfetamina, la administración estós fármacos provocan una conducta de giro. La conducta de giro es un indicador del grado de severidad de la lesión nigroestrial; la intensidad de la conducta de giro es proporcional a la degeneración del sistema dopaminérgico, y estos son los datos que se evalúan en un periodo de tiempo determinado (Blesa et

al., 2012). La administración de sustancias que aumentan la liberación de DA como la anfetamina produce una conducta de giro ipsilateral, mientras, que los agonistas dopaminérgicos como la apomorfina provocan giros contralaterales (Blesa *et al.*, 2012). La activación asimétrica debida a la zona de lesión es la causa de la respuesta rotatoria (Blesa *et al.*, 2012). También se aplican otras pruebas como: la de escalera, la de corredor y la de cilindro (Blesa *et al.*, 2012).

2.9 Terapias para la enfermedad de Parkinson

Los tratamientos farmacológicos se enfocan en gran medida a reducir los síntomas clínicos de la PD y no en detener su progresión (Arias-Carrión, 2008). Las terapias con L-Dopa o con agonistas dopaminérgicos, son efectivas al principio de la enfermedad, producen una mejoría sintomática y sin fluctuaciones, pero su eficacia disminuye al paso del tiempo, ya que no detienen el progreso de la PD, además, provocan numerosos efectos adversos, como el aumento de la inestabilidad postural y demencia. Por lo tanto, la falta de una respuesta adecuada a la PD conduce a los pacientes en fases finales a presentar graves limitaciones funcionales (Lunn *et al.*, 2011; Pawitan, 2011; Welchko *et al.*, 2012).

La terapia celular se enfoca en gran medida a curar la PD (Arias-Carrión, 2008), consiste en la renovación celular y el establecimiento de nuevas comunicaciones celulares (Isacson *et al.*, 2003), trasplantando células que sustituyen a las neuronas muertas y que restablecen la neurotransmisión dopaminérgica (Brundin *et al.*, 2008). La terapia celular utiliza como fuentes celulares las células embrionarias y células madre neuronales (NSC) adultas y embrionarias, que

representan una terapia alternativa para enfrentar la PD. La tecnología con células madre y NSC tanto adultas como embrionarias, se centran en la sustitución de las neuronas muertas en el sitio de la enfermedad, restableciendo las mallas neuronales e impulsando la síntesis de factores de crecimiento neuroprotectores como el: Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (BDNF), Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales (GDNF), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento parecido a Insulina tipo 1 (IGF1) (Lunn *et al.*, 2011; Pawitan, 2011; Welchko *et al.*, 2012).

Las células embrionarias son obtenidas de la masa interna del blastocisto y tienen características que son necesarias para ser una fuente óptima de células, como lo son la capacidad de proliferar o de autorenovación, además de diferenciarse a varios tipos celulares como astrocitos, oligodendrocitos y neuronas, entre otros (Lunn *et al.*, 2011).

En el cerebro adulto se pueden encontrar las NSC adultas, localizadas en dos nichos neurogénicos, uno en el hipocampo y otro en la zona subventricular. Las nuevas células generadas en estos nichos ayudan a mantener un número constante de células reponiendo las células muertas o dañadas en individuos sanos, sin embargo, en individuos con PD no hay una respuesta adecuada de estos nichos neurogénicos (Enciu *et al.*, 2011). Las NSC embrionarias se obtienen de la eminencia gangliónica de embriones de 14 días en el caso de la rata Sprague-Dawley (Muraoka *et al.*, 2008).

Otra fuente de células para trasplantar ya sea a un modelo o a casos clínicos de la PD son las células cromafines de la médula adrenal que pueden ser adultas o sus precursores embrionarios, debido a que son células que sintetizan DA como intermediario en la síntesis de adrenalina y además sufre cambios morfológicos adoptando las características de las neuronas catecolaminérgicas (Freed *et al.*, 1981; Drucker-Colín *et al.*, 1996; Arrias-Carrión, 2008).

Existen numerosos estudios sobre el trasplante de células en modelos animales, e incluso, se reportan aproximadamente 500 casos documentados alrededor del mundo en pacientes que han recibido un trasplante, y de ellos se ha obtenido un promedio de 30-40% de resultados benéficos (Arrias-Carrión, 2008).

Un estudio de 8 pacientes que recibieron trasplantes de células fetales y que posteriormente murieron por causas ajenas a la PD y al trasplante, demostraron el establecimiento de interacciones neuronales, además de una mejoría en la sintomatología de la PD, estas observaciones apoyan la idea de que estrategias de trasplante pueden resultar benéficas para pacientes con PD (Kordower *et al.*, 2008). NSC adultas obtenidas de la zona subventricular de ratas adultas fueron trasplantadas a un modelo de la PD, fue un trabajo realizado por Muraoka y colaboradores en 2008, en el que se demuestra que las NSC adultas tienen un potencial similar a NSC embrionarias.

Estudios recientes en modelos animales de la PD han revelado que el sitio, en donde se realiza el trasplante de células derivadas de células embrionarias e incluso de NSC, presentan la formación de teratomas, lo que sugiere que las células

madre indiferenciadas y NSC, pueden causar la formación de tumores debido a una incompleta diferenciación a neuronas dopaminérgicas o a fallas propias de la purificación (Bjorklund, 2004; Fukuda *et al.*, 2006; Muraoka *et al.*, 2008, Ko *et al.*, 2009; Ben-David y Benvenisty, 2011).

Células cromafines obtenidas de ratas adultas sanas fueron trasplantadas a un modelo de la PD con lesión unilateral en la SN y se demostró la supervivencia de las células trasplantadas con finas ramificaciones celulares y la mejoría de la conducta motora (Freed *et al.*, 1981). Después de estos resultados alentadores se realizó la valoración clínica en la cual se hizo el trasplante de células adultas propias de los pacientes, obtenidas de su médula adrenal, tiempo después de la cirugía de trasplante se demuestra que hay una mejoría de los síntomas clínicos y una disminución en las dosis de L-Dopa administrada, estos cambios fueron permanentes (Backlund *et al.*, 1985).

Paralelo al desarrollo del trasplante neuronal, el trasplante de células gliales ha evolucionado rápidamente (Franklin *et al.*, 2012). La idea del trasplante de células gliales se basa en el conocimiento que se tiene sobre su papel como soporte estructural y metabólico de las neuronas para su adecuada función y sobrevivencia (Schapira, 2009; Halliday *et al.*, 2011). El potencial terapéutico del trasplante de células gliales ha sido ya probado, en lesiones de médula espinal en modelos de rata se ha realizado el trasplante de células precursoras de oligodendrocitos. Los resultados son favorecedores, ya que, muestra la sobrevivencia de las células trasplantadas e inclusive una recuperación funcional en los animales que han

recibido el trasplante, además, mostraron que las células trasplantadas pueden migrar al sitio de daño (Lee *et al.*, 2005).

Otro caso en el que se ha reportado, el trasplante de células gliales fue a un modelo de la AD. Utilizaron astrocitos derivados de una línea celular progenitora glial. El análisis histológico mostró una adecuada sobrevivencia, migración y diferenciación a astrocitos (Xuan *et al.*, 2009).

3 Justificación

En la actualidad la población Mexicana presenta una esperanza de vida de 75.5 años, con una edad media de 26 años (INEGI, 2010), sin embargo, se ha calculado que para el año 2050 habrá 36 millones de personas por arriba de los 60 años (Guevara, 2010), y considerando que el principal factor de riesgo para padecer la PD es el envejecimiento, es necesario el desarrollo de investigaciones asociadas ya sea a la generación de nuevas terapias o factores involucrados con el inicio y progresión de la PD.

Debido a que la terapia farmacológica a largo plazo resulta insuficiente, ya que no detiene el progreso de la enfermedad y además provoca efectos adversos que acentúan las limitaciones funcionales en etapas avanzadas de la PD, se ha promovido el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas y/o la mejora de las terapias celulares. Las terapias celulares se basan en la sustitución de las células muertas y promueven la síntesis de factores neurotróficos (Lunn *et al.*, 2011; Pawitan, 2011; Welchko *et al.*, 2012). Los trasplantes de neuronas y células gliales

han sido probados en modelos de lesión en la médula espinal, en la AD, y de la ALS, los resultados son alentadores ya que no solo muestran la sobrevivencia de las células trasplantadas, sino también la migración de estas células al sitio de daño, e incluso una recuperación funcional en los animales que han recibido el trasplante (Lee *et al.*, 2005; Xuan *et al.*, 2009; Lepore *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2012; CSTMN, 2012).

Sin embargo, la mayoría de los trabajos con trasplantes celulares utilizan como fuente celular a células embrionarias o NSC tanto embrionarias como adultas, las cuales han demostrado presentar dos fuertes desventajas: la formación de tumores (Bjorklund, 2004; Fukuda *et al.*, 2006; Muraoka *et al.*, 2008, Ko *et al.*, 2009; Ben-David y Benvenisty, 2011) y la inmadurez funcional de las células trasplantadas.

Estudios anteriores han demostrado que el uso de células gliales como fuente celular para los trasplantes de algunos modelos de ND pueden promover la mejoría de los modelos, actualmente no hay estudios sobre el efecto del trasplante de neuronas y células gliales obtenidas de ratas adultas sanas a un modelo de la PD. Por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar el trasplante de neuronas y células gliales de ratas adultas sanas a un modelo de la PD, evitando así el uso de células precursoras neuronales y gliales que puedan por un lado promover la formación de tumores y por el otro nos aseguramos que las neuronas sean funcionales. Permittiéndonos observar de esta manera si hay una mejor adaptación y funcionalidad de las neuronas trasplantadas.

4 Pregunta de Investigación

¿Las neuronas y células gliales obtenidas de la *sustancia nigra* de ratas adultas sanas cultivadas “in vitro” podrán establecer interacciones con células del cerebro medio de un modelo de la enfermedad de Parkinson en rata Wistar que permitan restablecer la actividad dopaminérgica y una mejoría conductual?

5 Hipótesis

Si células funcionales de la *sustancia nigra* de individuos sanos adultos se adaptan favorablemente a microambientes *in vivo* propios de la enfermedad de Parkinson, entonces se restaurará la actividad dopaminérgica propiciando una mejoría conductual.

6 Objetivo General

Valorar el trasplante de neuronas y células gliales de la *sustancia nigra* de ratas adultas sanas a un modelo de la enfermedad de Parkinson en rata Wistar.

7 Objetivos Específicos

Establecer un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas macho de la cepa Wistar.

Determinar el grado de lesión del modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas macho de la cepa Wistar.

Definir el procedimiento de trasplante a un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas macho de la cepa Wistar.

Valorar la conducta motora del modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas macho de la cepa Wistar con trasplante de células de ratas adultas sanas.

Describir la organización histológica del modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas macho de la cepa Wistar con trasplante de células de ratas adultas sanas.

8 Material y Método

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250-300 g. Los animales estuvieron alojados en cajas, en cuartos con temperatura controlada y con un fotoperíodo de luz–obscuridad de 12/12 horas, así como libre acceso al agua y a los alimentos. La manipulación de los ejemplares animales se hizo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995), realizando máximos esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal.

8.1 Grupos experimentales

Para estandarizar el sitio de inyección ya sea para la lesión con 6-OHDA o el trasplante se formaron los siguientes grupos:

1. Control: 3 ejemplares que no fueron sometidos a cirugía estereotáxica para ubicar la SN haciendo uso del atlas Watson y Paxinos (2007)

2. Control de lesión: 2 ejemplares que fueron sometidos a cirugía estereotáxica para aprender sobre el uso y manejo del aparato estereotáxico.
3. Marcado con Azul de Evans: 5 ejemplares que fueron sometidos a cirugía estereotáxica a los cuales se les administro 5 μ l del colorante azul de Evans para confirmar que el sitio de depósito del colorante coincidiera con la ubicación de la SN en base al atlas de Watson y Paxinos (2007).

Para evaluar el efecto del trasplante de neuronas y células gliales obtenidas de ratas adultas sanas se manejaron los siguientes grupos:

1. **Control:** 5 ejemplares que no fueron sometidos a cirugía estereotáxica.
2. **Control de Lesión:** 4 ejemplares que fueron sometidos a cirugía estereotáxica para la administración unilateral en la SN de 4 μ l de solución salina más ácido ascórbico.
3. **Lesionado 6-OHDA:** 20 ejemplares que fueron sometidos a cirugía estereotáxica para la administración unilateral en la SN de 4 μ l de la neurotoxina 6-OHDA disuelta en solución salina más ácido ascórbico. Los cuales fueron divididos en 10 ejemplares que recibieron el trasplante, 5 ejemplares para formar el grupo control de trasplante y finalmente 5 ejemplares para realizar la evaluación histológica del grupo lesionado.
4. **Control de Trasplante:** 5 ejemplares que tenían lesión unilateral en la SN con la neurotoxina 6-OHDA y que posteriormente recibieron por cirugía estereotáxica 1 μ l de medio de cultivo en la SN, T y ST .
5. **Trasplantados:** 10 ejemplares que tenían lesión unilateral con la neurotoxina 6-OHDA en la SN y que posteriormente recibieron por cirugía estereotáxica en la SN, T y ST 1 μ l de una suspensión celular que contenía tanto neuronas como células gliales.

Para determinar la recuperación del modelo de la EP se evaluó la conducta durante 8 semanas de los siguientes grupos.

1. **Control:** 5 ejemplares que no fueron sometidos a cirugía estereotáxica.
2. **Lesionado 6-OHDA:** 5 ejemplares que fueron sometidos a cirugía estereotáxica para la administración unilateral en la SN de 4 μ l de la neurotoxina 6-OHDA disuelta en solución salina más ácido ascórbico.

8.2 Modelo de la enfermedad de Parkinson en Rata Wistar (Cirugía de lesión)

La mesa de cirugía y el equipo de cirugía estereotáxica fueron desinfectados con soluciones alcohólicas. Las ratas fueron anestesiadas por medio de la administración intraperitoneal de pentobarbital (30 mg/kg). Para los grupos de animales lesionados los animales recibieron una inyección estereotáxica unilateral de 4 μ l de 6-OHDA (4 μ g/ 2 ml de solución salina al 0.9% que contiene 0.2 mg/ml de ácido ascórbico) utilizando una jeringa Hamilton en el cerebro medio bajo las siguientes coordenadas en milímetros con referencia a bregma y dura de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson:

Anteroposterior (AP): -5.3 mm

Mediolateral (ML): -2.3 mm

Dorsoventral (DV): -8.0 mm (De Vente *et al.*, 1994).

8.3 Evaluación Conductual

Para evaluar el modelo de Parkinson inducido por la neurotóxina 6-OHDA se recurrió a medir el comportamiento motor (Véase Fig. 5) a través de las pruebas de: 1) apomorfina, 2) cilindro, 3) de elevación corporal y 4) campo abierto (Borlongan y Sanberg 1995). Pruebas que nos permitieron obtener un análisis de la situación funcional del cerebro de rata lesionada con 6-OHDA (Winkler *et al.*, 2000).

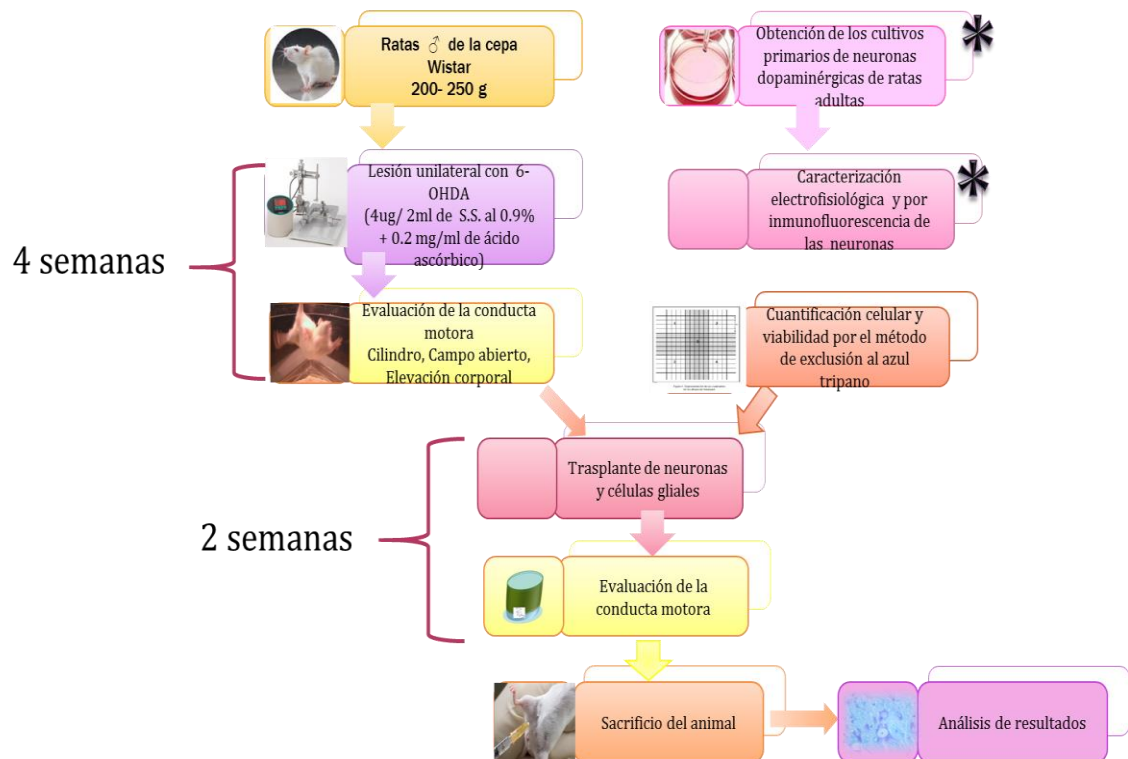


Fig. 5. Diagrama del Método

Diagrama del método realizado, con excepción de la obtención de los cultivos primarios y la caracterización electrofisiológica, marcados con un asterisco en el presente diagrama.

Prueba de rotación inducida por apomorfina

Se hizo una curva dosis respuesta para la administración de apomorfina, las dosis empleadas fueron las siguientes: 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg. Se administró la apomorfina de forma intraperitoneal, posteriormente se colocó a los ejemplares dentro de un cilindro de acrílico y se observó su conducta motora durante 1 hora. La variable a cuantificar son las rotaciones en dirección contralateral al sitio lesión durante 1 hora.

Prueba de cilindro

Se colocó a la rata en un cilindro transparente durante 5 minutos y se contabilizó el número de veces que tocaban las paredes laterales del cilindro ya sea con la pata ipsilateral y contralateral respecto a la lesión (Winkler *et al.*, 2000).

Prueba de elevación corporal

Se colocó al animal en un redondel durante dos minutos para que este se habitúe a estar en un estado de cuatro patas, pasado este lapso de tiempo se tomó al animal a 1 pulgada de distancia de la base de la cola, se elevó y se colocó a una distancia de 1 pulgada sobre el piso. Se evaluó durante 1 minuto hacia donde se balancea este, hacia la derecha o hacia la izquierda (Borlongan *et al.*, 1995).

Prueba de Campo abierto

Se caracterizó la actividad exploratoria de los diversos grupos, los animales se colocaron en el centro de una caja de acrílico (60x60x30) dividida en 4 partes iguales

mediante dos líneas perpendiculares entre si, las sesiones fueron filmadas durante 5 minutos. La variable a evaluar fue la distancia recorrida total.

8.4 Obtención de los Cultivos Primarios de Ratas Adultas Sanas

Las neuronas dopaminérgicas fueron obtenidas de ratas adultas sanas y fueron colocadas en un medio de mantenimiento artificial. Se utilizaron ratas con un peso entre 150-200 g, el ejemplar fue anestesiado por inhalación utilizando 10 ml de isofluorano, se limpió la cabeza del animal con alcohol del 70 y posteriormente se procede al sacrificio del animal con una sobredosis de isofluorano. Rápidamente se decapita y obtiene el cerebro, el cual se coloca en una solución de HBS durante 1 minuto, pasado este lapso de tiempo se procede a hacer la disección de la SN y se coloca el tejido en una solución de HBS. Finalmente el tejido fue disgregado con una solución de Tripsina/EDTA al 0.125% en 25 ml de solución Hank. Las células fueron mantenidas en 10 ml medio de cultivo neurobasal hasta su utilización. Se tomó una alícuota de 50 μ l de suspensión para la cuantificación celular, 50 μ l para los sitios de trasplante y el resto de células extraídas de la SN fueron cultivadas y después de una semana fueron evaluadas electrofisiológicamente para verificar la presencia de las neuronas dopaminérgicas, ya que estas presentan señales eléctricas características (Hernández, 2013). Las células de cultivos primarios fueron proporcionados por el estudiante de posgrado en Ingeniería Biomédica Rafael Hernández Castillo y la alumna de la licenciatura en Ingeniería Biomédica Paulina

Hernández Garces, que se encuentran bajo supervisión del Dr. Rafael Godínez Hernández del Departamento de Ingeniería Eléctrica UAM-Iztapalapa.

8.5 Cuantificación y Viabilidad Celular

Una vez que obtenidas las neuronas y células gliales de la SN dissociadas, se hizo la cuantificación de las células y se determinó la viabilidad de la suspensión celular proporcionada a través del método de exclusión al azul tripano. Para determinar la viabilidad se tomaron 50 μ l de suspensión celular y se colocaron en un tubo ependorf, al mismo tubo se le colocó 50 μ l de una solución de azul de tripano (0.02 g de azul tripano en 10 ml de PBS) se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente, previo a la cuantificación celular.

8.6 Cirugía de Trasplante

Las ratas fueron anestesiadas con la administración intraperitoneal de pentobarbital (30 mg/kg), y de isoflurano inhalado. Después se colocó a los animales en el marco estereotáxico Kopf y se administró una inyección de 1.0 μ l (0.25 μ l/min) de la suspensión celular, usando una jeringa Hamilton y recibió aprox. 20,000 cél/ul. Las coordenadas se pueden observar en la tabla 1.

Coordenadas de trasplante			
	Sitio 1 (<i>Sustancia Nigra</i>)	Sitio 2 (Tálamo)	Sitio 3 (Cuerpo estriado)
AP	-5.3 mm	-2.5 mm	-0.4 mm
ML	-2.3 mm	-2.65 mm	-3.0 mm
DV	-8.0 mm	-6.5 mm	-5.0 mm

Tabla 1. Coordenadas de trasplante.

Coordenadas en milímetros con referencia de bregma y dura de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007), colocando en cada sitio 20,000 células.

8.7 Descripción Morfológica y Funcional de las Células Trasplantadas

Una vez que se completadas las pruebas conductuales posteriores al trasplante de células, se comenzó con el análisis de los cerebros, el cual se realizó dos semanas posteriores a la cirugía de trasplante. Los animales fueron sacrificados y fijados por riego intravascular con paraformaldehído (4% en buffer de fosfatos pH 7.2-7.4). Los cerebros fueron procesados para microscopía de luz y las técnicas de tinción empleadas fueron: Hematoxilina-Eosina y Kluver-Barrera, se realizaron cortes seriados coronales de 7 μ m de espesor de los cerebros de los diferentes grupos para evaluar la organización tisular, posteriormente el material fue analizado con el microscopio Axioskop 2 con cámara AxioCamMRc5 y software Axiovision 4.8 (Carl Zeiss).

8.8 Análisis estadístico.

Para realizar la evaluación de la conducta de la prueba de cilindro, prueba de elevación corporal y campo abierto se utilizó la prueba ANOVA de mediciones repetidas seguido de Tukey. Para el análisis histológico se utilizó la prueba ANOVA seguido de Tukey (Borlongan y Sanberg 1995). La mayoría de los datos son expresados en términos de porcentaje haciendo referencia a la media \pm error estándar. Los análisis estadísticos y las gráficas fueron realizadas con el programa de NCSS 2007 (versión 07.1.18) y GraphPad Pris (versión 5.01) respectivamente. El nivel de significancia para todas las pruebas fue de $p < 0.05$.

9 Resultados

Identificación Microscópica de la SN

La SN se localiza en la base del mesencéfalo. La SN está ubicada ventralmente con respecto al VTA y dorsalmente con respecto al pedúnculo cerebral, se encuentra flanqueada por el núcleo medial terminal accesorio del tracto óptico y el núcleo perpendicular.

9.1 Estandarización de la zona de lesión

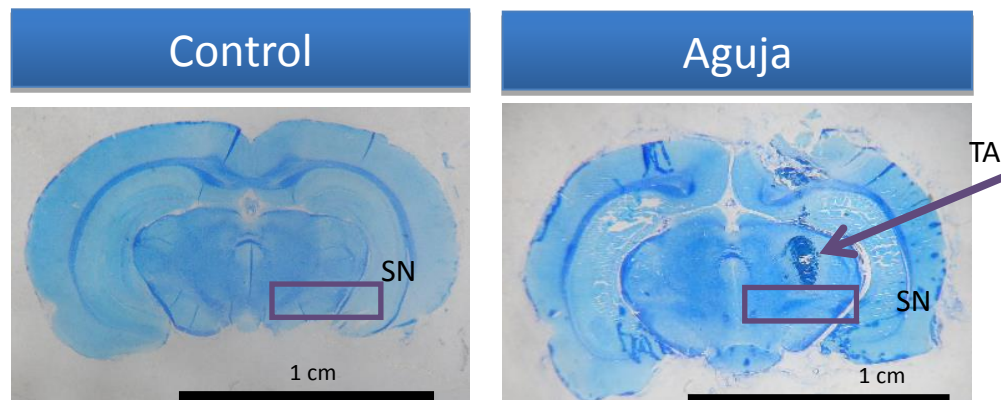


Fig. 6. Zona de lesión.

Corte coronal de cerebro de rata donde se visualiza la zona de lesión inducida por cirugía estereotáxica, corte teñido con Kluver Barrera. Abreviaturas: *Substantia Nigra* (SN), *Trayecto de la Aguja* (TA).

Identificación Macroscópica de la Sustancia Nigra

Fotomicrografía de corte coronal a nivel mesencefálico (plano interneural 3.7 mm, Bregma 5.3 mm) del cerebro de rata Wistar macho. En el eje dorso-ventral se observan la corteza cerebral, hipocampo, núcleos pretectales, retroetmoideo y lemnisco medial, la SN y el pedúnculo basal. En la región ventral-medial se presenta el núcleo mamilar. El tercer ventrículo se encuentra de forma perpendicular al núcleo mamilar en coincidencia con el eje dorso-ventral.

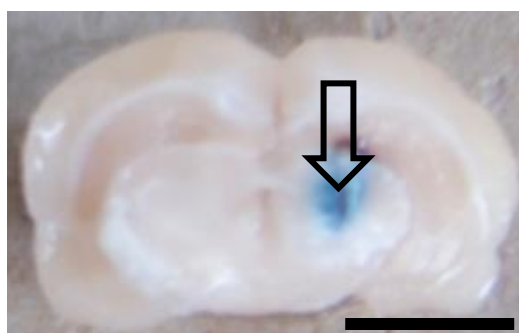


Fig. 7. Zona de lesión y depósito de colorante.

Corte coronal de cerebro de rata, donde se observa el sitio de inyección y el sitio de depósito del colorante azul de Evans que fue administrado por cirugía estereotáxica en SN. Trayecto de la Aguja (TA).

9.2 Cuantificación celular y viabilidad celular de la suspensión celular a trasplantar

Se determinó la cantidad de células que se obtienen del protocolo de extracción de células adultas sanas realizado por Rafael Hernández Castillo y Paulina Hernández Garces, se contabilizaron un promedio de 130 000 células, de las cuales se tomaban 20 000 células para cada sitio de trasplante. La viabilidad celular determinada por el método de exclusión de azul de tripano muestra que

el procedimiento para la extracción de células dopaminérgicas es el adecuado ya que la viabilidad calculada fue del 94%.

9.3 Evaluación de la conducta motora después de la lesión con 6-OHDA en la sustancia nigra y del trasplante de neuronas y células gliales.

Para la evaluación del rendimiento del comportamiento motor, las pruebas se realizaron durante las 4 semanas inmediatas después de la lesión con 6-OHDA y durante las 2 semanas inmediatas después del trasplante de neuronas y células gliales.

La prueba de rotación inducida por la apomorfina no mostró inducir rotaciones en el modelo de lesión por la inyección unilateral de 6-OHDA en la SN generado en este trabajo (datos no mostrados).

En la Fig. 8 se representan los resultados ($p < 0.05$) de la media del porcentaje de elevaciones corporales hacia el hemisferio izquierdo de los cinco grupos analizados \pm error estándar. El grupo control presentó un porcentaje de elevación a la derecha de un 52.6%, el grupo lesionado con 6-OHDA en la SN presenta 83.3% de elevaciones a la izquierda evidenciando claramente una asimetría en esta evaluación conductual y que se mantiene con el grupo control de trasplante que presenta 78.1%, una vez que las ratas lesionadas con 6-OHDA reciben el trasplante las neuronas y células gliales presenta un porcentaje de 55.8%.

Prueba de Elevación Corporal

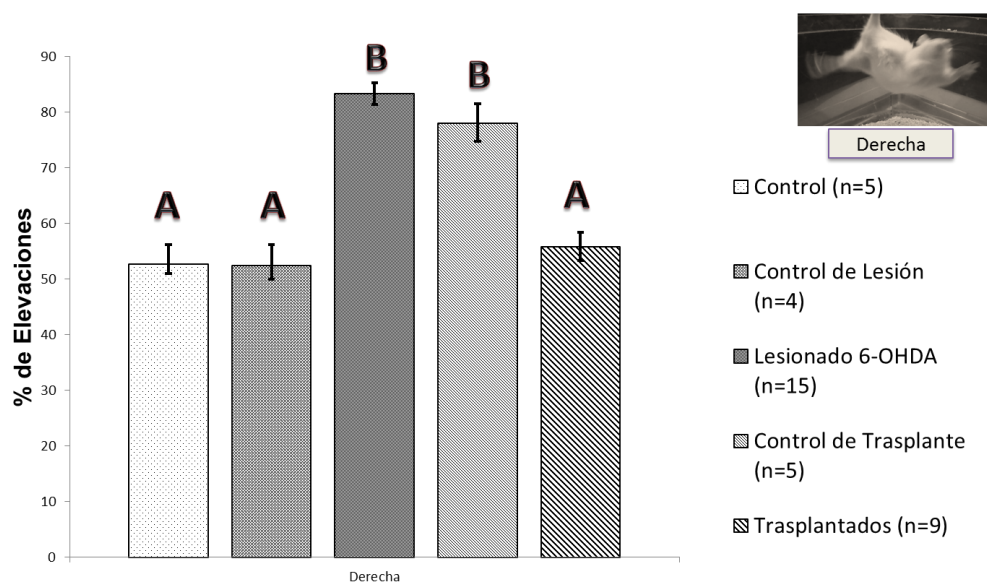


Fig. 8. Efecto de la lesión en la *sustancia nigra* con 6-OHDA y del trasplante de neuronas y células gliales sobre la elevación corporal de la rata.

Las elevaciones corporales de las ratas controles aumentan después de la cirugía de lesión en la SN con 6-OHDA, y posteriormente disminuye este porcentaje de elevaciones en las ratas que recibieron el trasplante. El resultado es expresado como el promedio del porcentaje de elevaciones corporales hacia la derecha e izquierda \pm error estándar. $p < 0.05$. Prueba ANOVA de mediciones repetidas seguido de Tukey. Los grupos marcados con "A" son estadísticamente diferentes a los grupos marcados con "B".

En la prueba de cilindro el resultado es expresado como la media del porcentaje de toques \pm error estándar. El grupo control presentó un porcentaje de toques con la extremidad izquierda de 50.2% que es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a los grupos lesionado con la neurotoxina 6-OHDA 83.55% y al grupo control de trasplante que presentó 76.1 y el grupo que recibe el trasplante de neuronas y células gliales muestra una disminución del porcentaje de uso de la extremidad anterior izquierda a 59.89%, similar al grupo control.

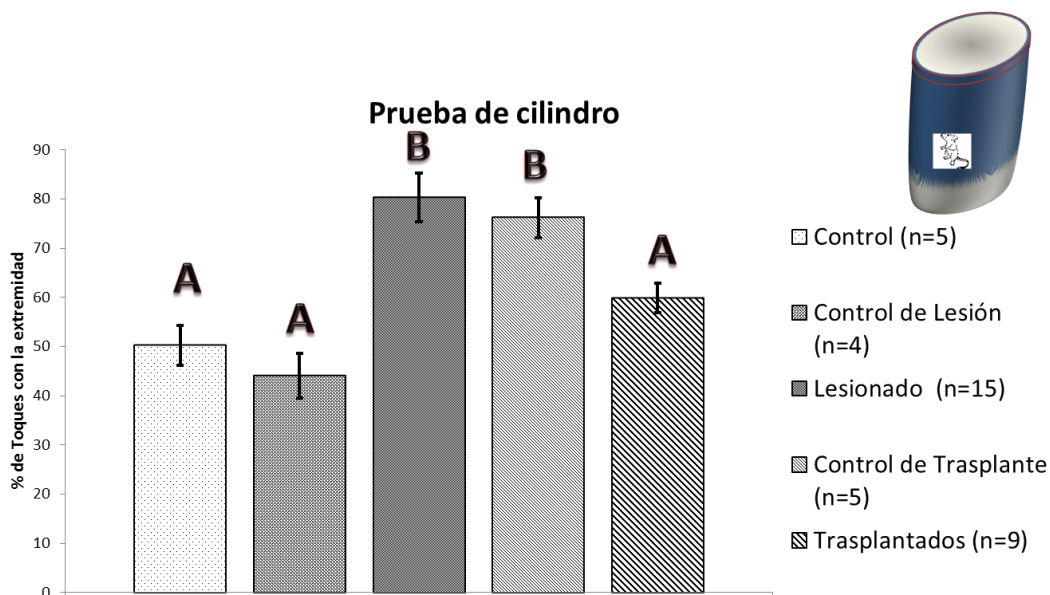


Fig. 9. Efecto de la lesión en la *sustancia nigra* con 6-OHDA y del trasplante de neuronas y células gliales sobre la elevación corporal de la rata.

La prueba de cilindro muestra un aumento significativo del uso de la extremidad anterior izquierda en los animales lesionados de forma unilateral con la neurotoxina 6-OHDA en la SN, y las ratas que reciben el trasplante de células presentan una disminución del porcentaje de toques con la extremidad izquierda. Resultados expresados como el promedio del porcentaje de toques \pm error estándar. $p < 0.05$. Prueba ANOVA de mediciones repetidas seguido de Tukey. Los grupos marcados con "A" son estadísticamente diferentes a los grupos marcados con "B".

El establecimiento de la actividad motora en la prueba de campo abierto (véase Fig. 10) revela el efecto de la lesión con 6-OHDA sobre la distancia recorrida ($p < 0.05$), el grupo control recorrió 1000 cm, el grupo con lesión unilateral en la SN con 6-OHDA recorrió 731 cm, similar al grupo control de trasplante con 769 cm y el grupo que recibió el trasplante de neuronas y células gliales recorrieron 1048 cm, se restablece la actividad motora comparado al grupo control.

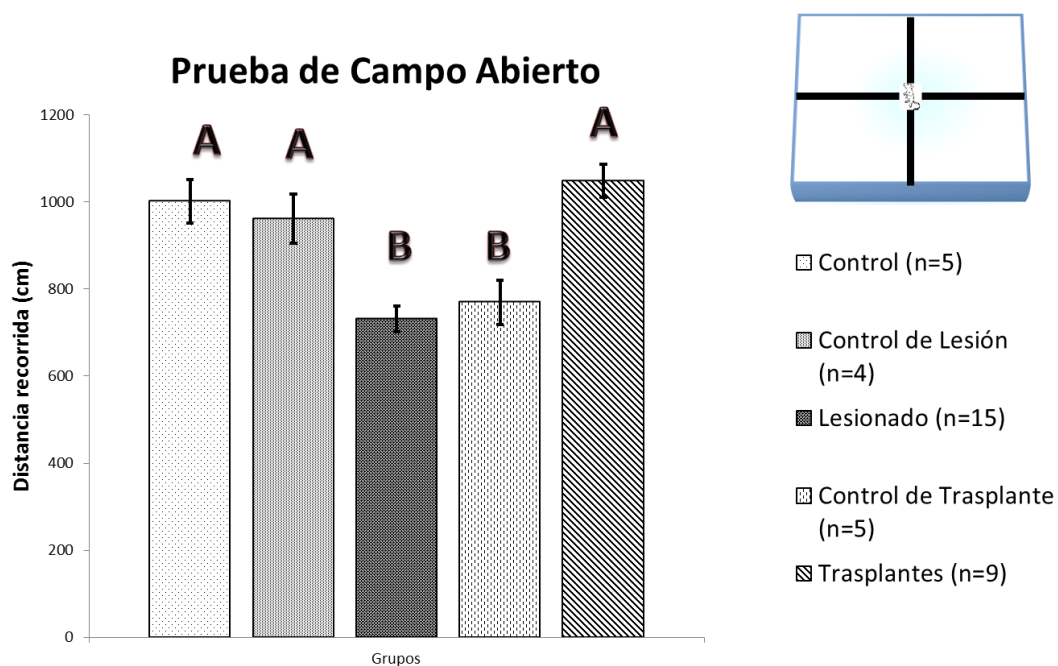


Fig. 10. Efecto de la lesión en la *sustancia nigra* con la neurotoxina 6-OHDA y del trasplante de neuronas y células gliales sobre el comportamiento motor.

El grupo lesionado con la neurotoxina 6-OHDA tiene una disminución significativa en la distancia recorrida en comparación con el grupo control y control de lesión, después de haber recibido el trasplante de células el grupo lesionado recupera la actividad motora de forma significativa en la prueba de campo abierto, igualando la distancia recorrida del grupo control. Los datos son expresados como los centímetros (cm) recorridos totales \pm error estándar. * $p < 0.05$ ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Los grupos marcados con la letra a son estadísticamente diferentes al marcado con la letra b.

9.4 Evaluación conductual del modelo de la enfermedad de Parkinson durante 8 semanas

Para observar si hay cambios en el déficit motor producido por la cirugía de lesión con la neurotoxina 6-OHDA conforme pasa el tiempo, se evaluó la conducta motora durante 8 semanas después de haber realizado la cirugía de lesión.

La prueba de elevación corporal muestra que el aumento de elevaciones corporales a la derecha permanece constante durante los primeros 30 días que corresponden a las 4 semanas de haberse realizado la cirugía de lesión (línea roja) y la reportada anteriormente, 2 semanas después es decir la semana 6 (línea azul) se muestra una ligera disminución del porcentaje de elevaciones que se restablece durante la semana 8 (véase Fig. 11a). La prueba de cilindro muestra que el aumento de toques con la extremidad anterior izquierda es mantenido durante las primeras 4 semanas inmediatas a la cirugía de lesión, en la semana 6 comienza la disminución del porcentaje de toques que continua durante la semana 8 (véase Fig. 11b). Mientras que la prueba de campo abierto muestra que la disminución en la distancia recorrida se mantiene durante las 8 semanas después de haberse realizado la cirugía de lesión (véase Fig. 11c).

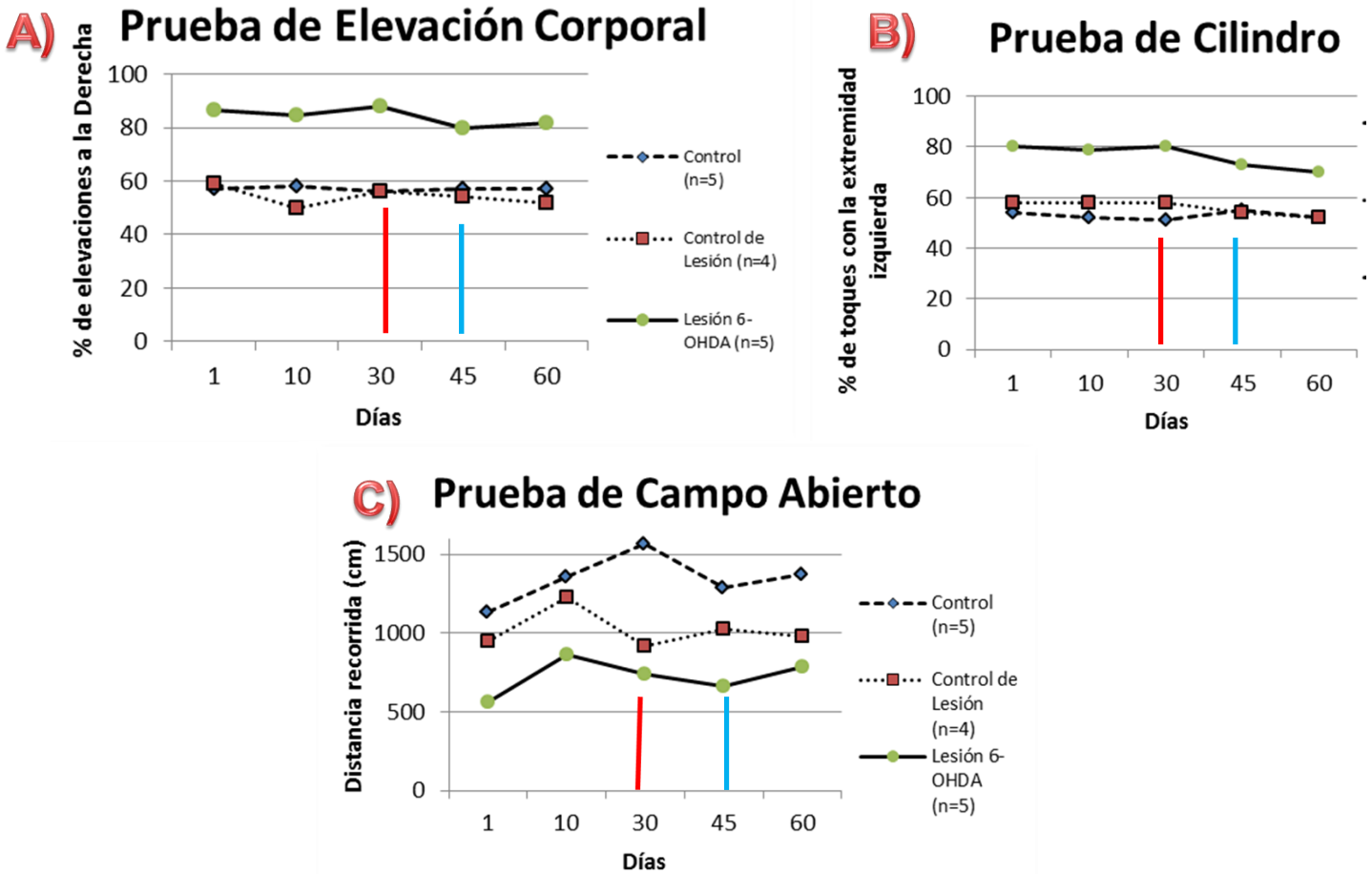


Fig. 11. Evaluación conductual durante 8 semanas del modelo de la enfermedad de Parkinson

El grupo que fue lesionado de forma unilateral con la neurotoxina 6-OHDA en la SN, demuestra que el déficit motor es constante después de 4 semanas de haberse realizado la cirugía de lesión, y que comienza a disminuir a partir de la semana 6 a la 8. Resultado expresado como el porcentaje de la actividad motora. Línea roja= marca de la 4 semana después de la cirugía de lesión, Línea azul= marca de la 6 semana después de la cirugía de lesión.

Posteriormente se comparó la disminución del déficit motor de los grupos lesionados con 6-OHDA sin trasplante y el grupo lesionado con 6-OHDA que recibió el trasplante (véase Fig. 12), se puede observar una mayor disminución del déficit motor para cada una de las pruebas en el grupo que recibió el trasplante.

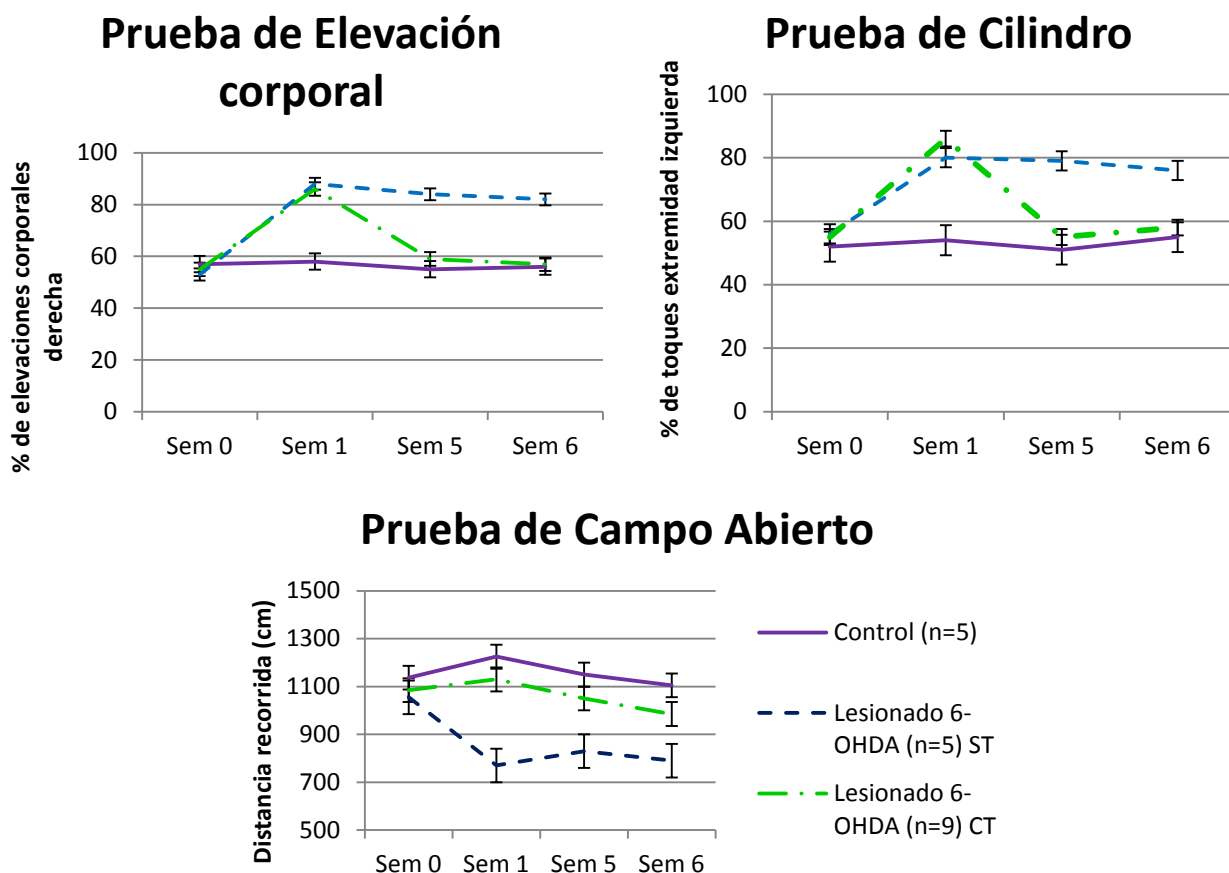


Fig. 12. Evaluación conductual durante 8 semanas del modelo de la enfermedad de Parkinson

Semana 0 fue el inicio del experimento, cuando los animales no habían sido sometidos a cirugía de lesión, durante la semana 1 los animales del grupo lesionado y trasplantado fueron sometidos a cirugía de lesión y al final de la semana evaluados conductualmente. Al principio de la semana 2 se hizo la lesión con 6-OHDA y al final de la semana fueron evaluados conductualmente. En la 5^{ta} y 6^{ta} semana los animales con y sin trasplante de células fueron evaluados conductualmente. El grupo que fue lesionado de forma unilateral con la neurotoxina 6-OHDA en la SN, demuestra que el déficit motor presenta una

ligera disminución después de la 5^{ta} y 6^{ta} semana de haberse realizado la cirugía de lesión, sin embargo la disminución del déficit motores es más evidente en el grupo que recibió el trasplante de neuronas y células gliales. Abreviatura: semana (sem), sin trasplante (ST), con trasplante (CT).

9.5 Supervivencia de las células trasplantadas y análisis morfológico de las células trasplantadas después de dos semanas del trasplante.

Se cuantificaron las células presentes en cada ejemplar de cada grupo, para el caso del grupo control, control de lesión y lesionado con 6-OHDA, el conteo de células se realizó de forma diferencial, es decir, se cuantificó a cada subtipo celular, neuronas y células gliales, debido a que en estos casos cada subtipo celular presenta un morfología característica, las neuronas dopaminérgicas son grandes con un soma que mide aprox. 20 μm , un núcleo prominente, un nucleolo definido, a diferencia de las células gliales que son células pequeñas sin un núcleo visible. La cuantificación de neuronas nos muestra que las ratas lesionadas unilateralmente con la neurotoxina 6-OHDA en la SN tienen una disminución de neuronas en comparación con el grupo control y control de lesión (véase Fig. 13).

En base a los resultados obtenidos se determinó las siguientes relaciones celulares (neurona- célula glial):

Control= 7:1

Control de lesión= 7:1

Lesionado= 13:1

Cuantificación de Neuronas y Células Gliales en la SN

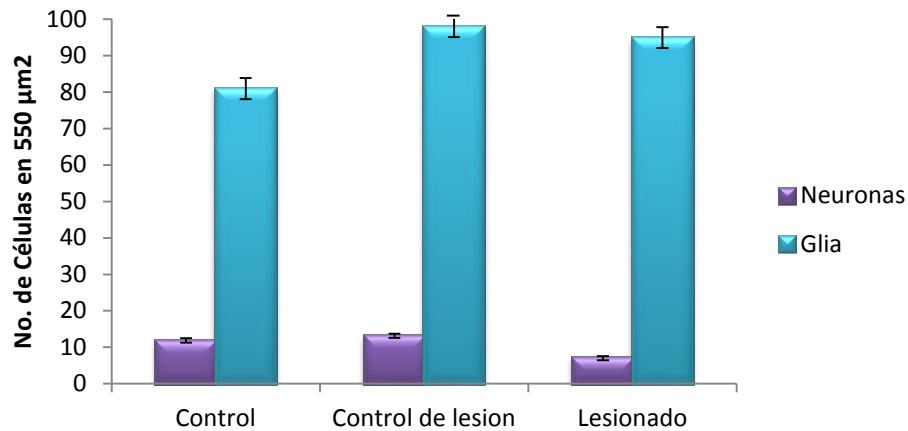


Fig. 13. Cuantificación de células en el modelo de la EP

Se muestra una disminución del porcentaje de neuronas en el modelo de la EP en comparación del grupo control y control de lesión. También se observa el aumento de células gliales en el grupo control de lesión y grupo lesionado. Resultado expresado como el número de neuronas y células gliales en 550 μm² de SN ± error estándar.

Para el caso de los animales que han recibido el trasplante de neuronas y células gliales, los sitios de trasplante fueron fácilmente identificados en todos los casos (véase Fig. 17, 18 y 19), sin embargo, el conteo de neuronas y células gliales supervivientes al trasplante a las dos semanas no fue posible, debido a que no se pudo observar la morfología típica para los dos tipos celulares trasplantados, motivo por el cual se realizó sólo la cuantificación de células en el sitio de trasplante. Se puede observar el incremento en la densidad celular en el grupo de animales que recibieron el trasplante de neuronas y células gliales, en comparación con todos los grupos (véase Fig. 14, 15 y 16).

Células en la Sustancia Nigra

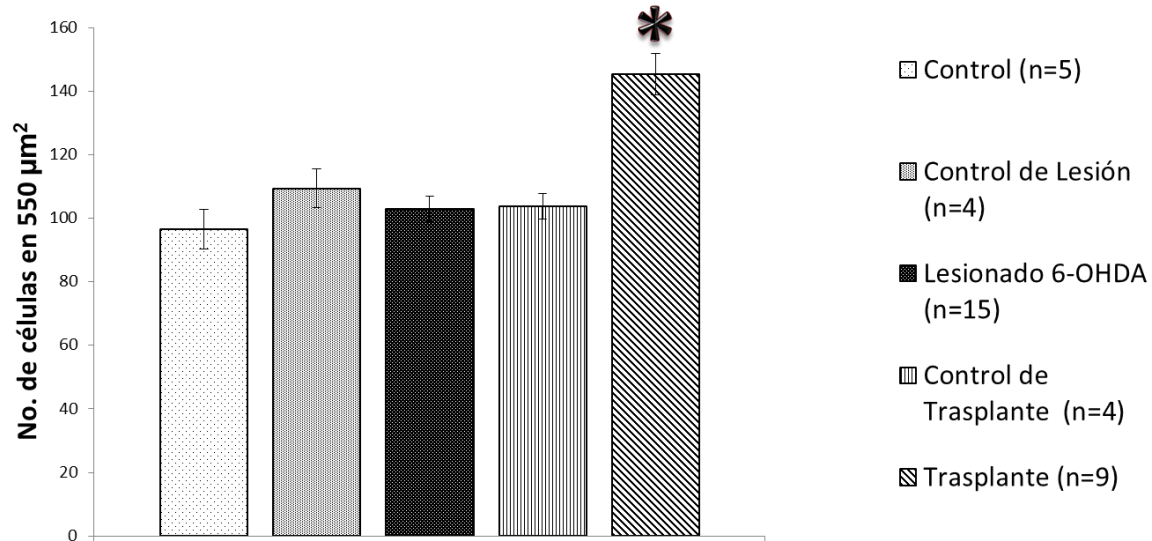


Fig. 14. Cuantificación de Células Supervivientes en la *sustancia nigra* del modelo de la EP

Se muestra un aumento en la densidad celular en el modelo de la EP que recibió el trasplante en la SN comparación a todos los grupos. Resultado expresado como la mediana del número de células en 550 μm^2 de SN + error estándar. * $p < 0.05$. ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

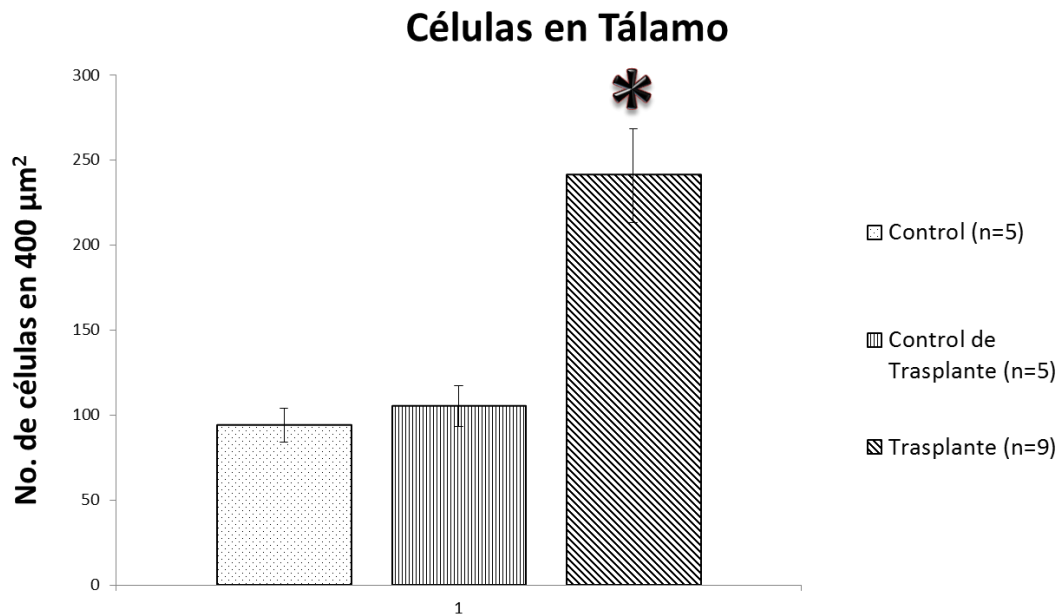


Fig. 15. Cuantificación de Células Supervivientes en el tálamo del modelo de la EP

Se muestra un aumento en la densidad celular en el modelo de la EP que recibió el trasplante en el T en comparación al grupo control de trasplante. Resultado expresado como la mediana del número de células en 400 μm^2 de T + error estándar. * $p < 0.05$. ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

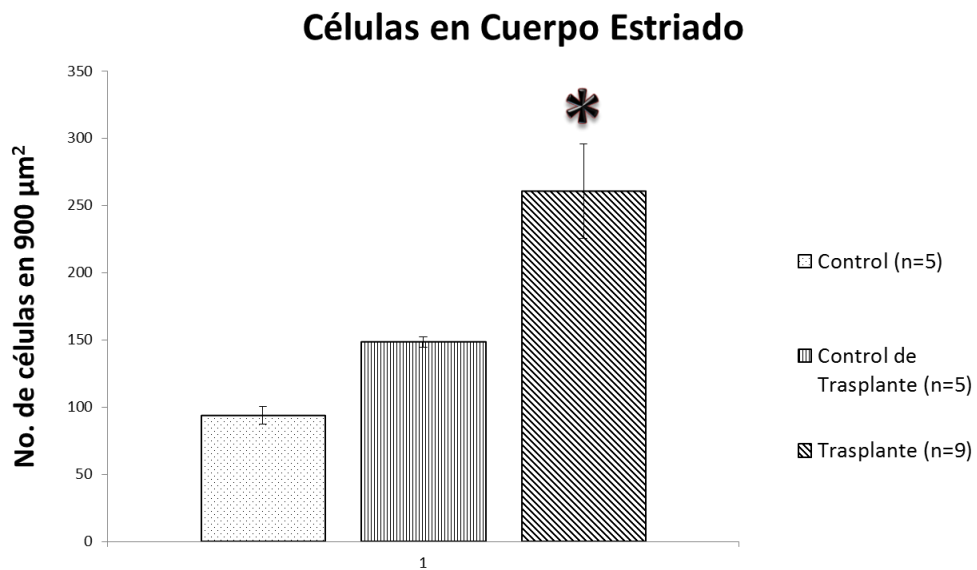


Fig. 16. Cuantificación de Células Supervivientes en el cuerpo estriado del modelo de la EP

Se muestra un aumento en la densidad celular en el modelo de la EP que recibió el trasplante en el ST comparación al grupo control de trasplante. Resultado expresado como la mediana del número de células en 900 μm^2 de ST + error estándar. * $p < 0.05$. ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

Fig. 17. Fotomicrografías de la *Sustancia Negra*.

Fotomicrografías de cortes coronales de la SN teñidos con la técnica de Kluver-Barrera y Hematoxilina-Eosina. Aumento original X400

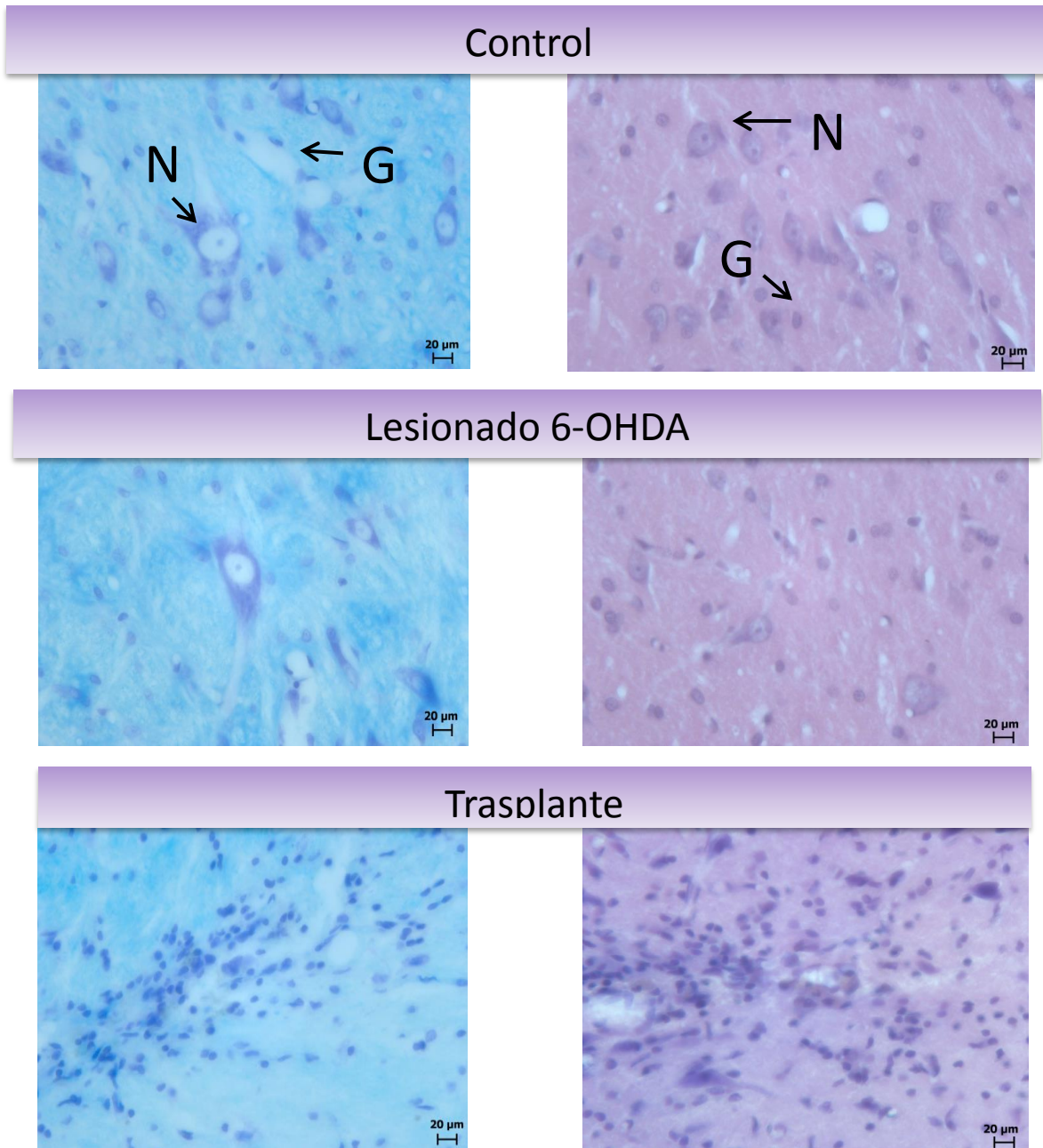


Fig. 18. Fotomicrografías del Tálamo.

Fotomicrografías de cortes coronales de T teñidos con la técnica de Kluver-Barrera y Hematoxilina-Eosina. Barra de Escala 20 μ m. Aumento original X400

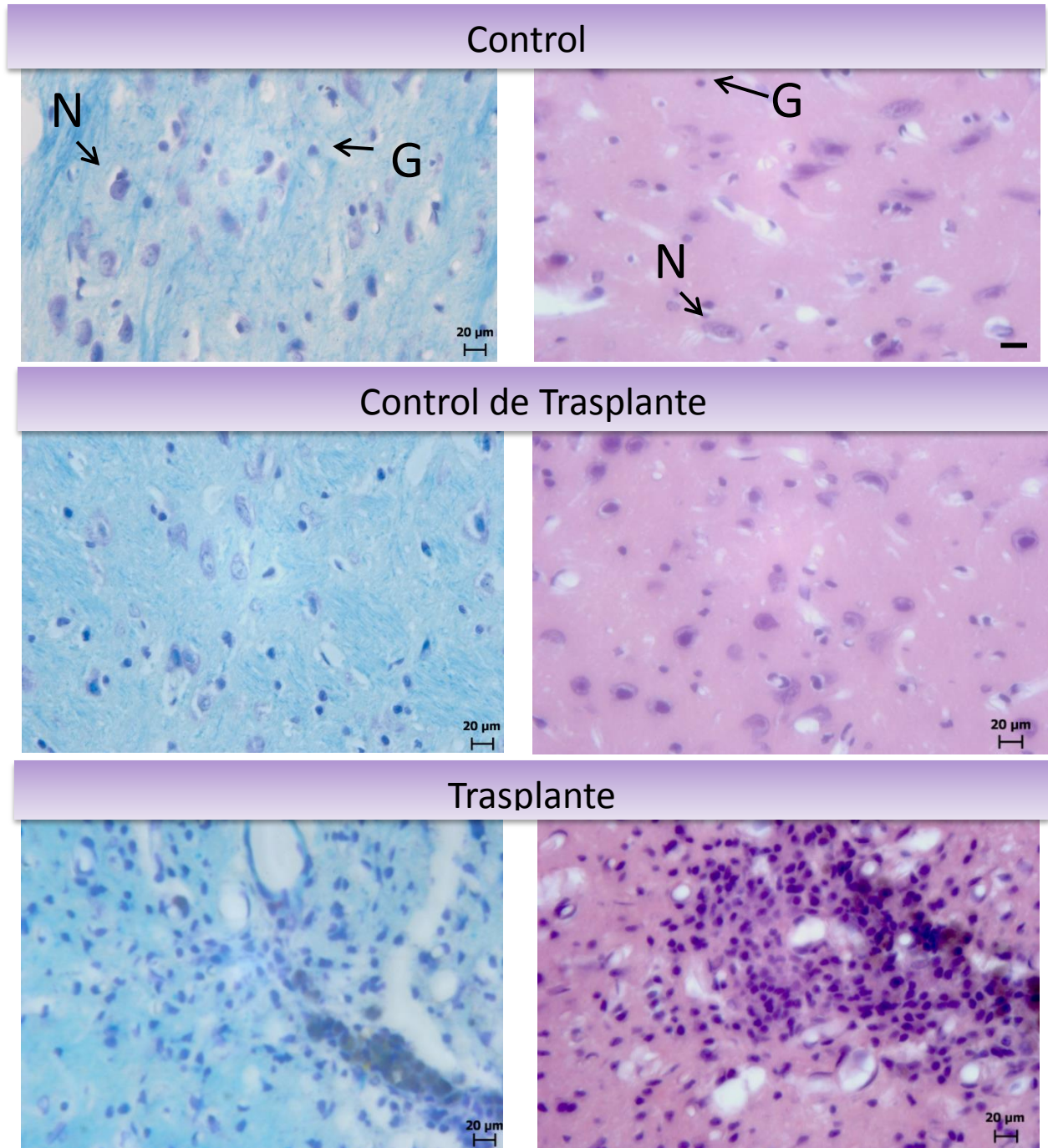
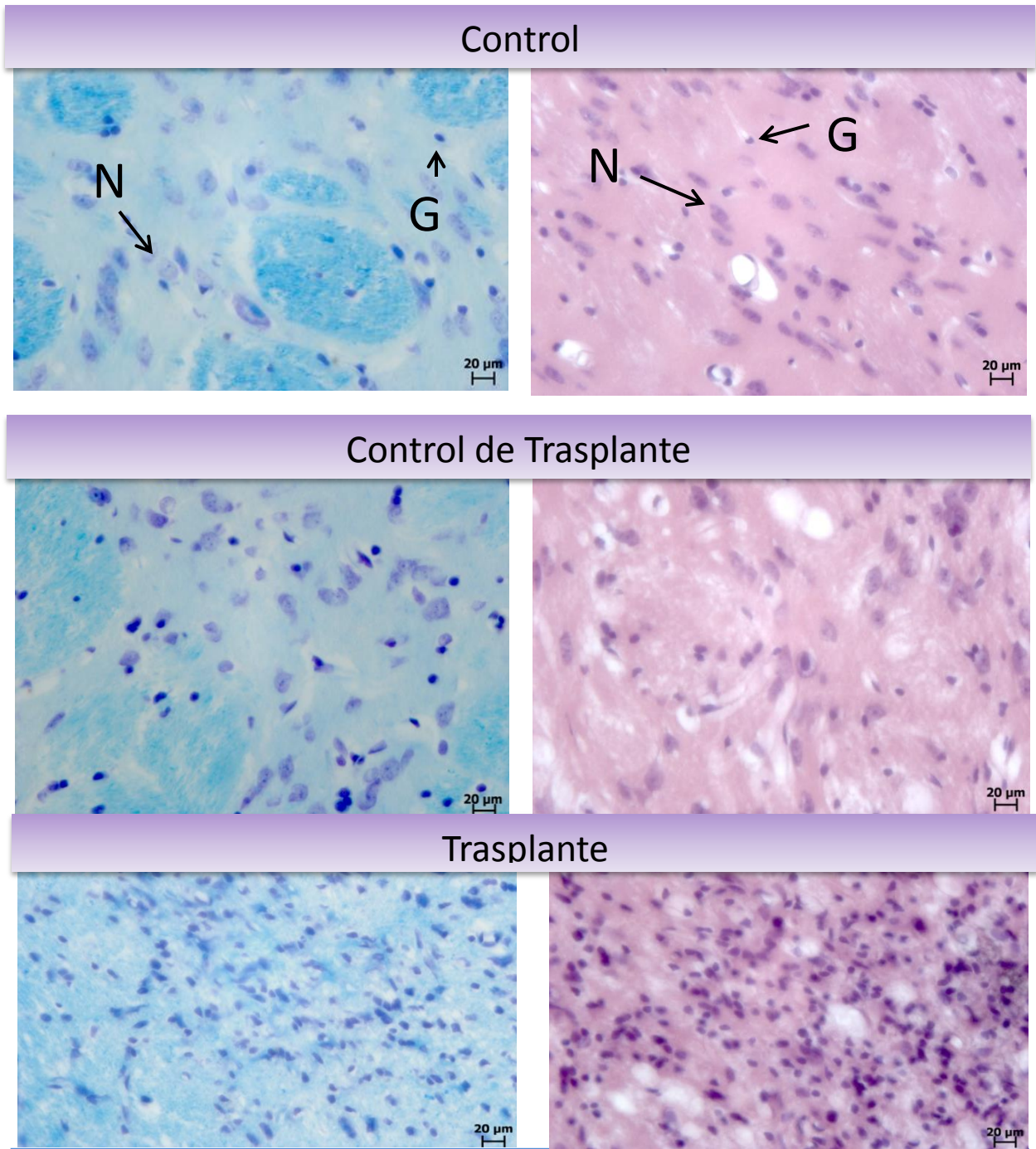


Fig. 19. Fotomicrografías de Cuerpo Estriado.

Fotomicrografías de cortes coronales de ST teñidos con la técnica de Kluver-Barrera y Hematoxilina-Eosina. Aumento original X400



10 Discusión

Este estudio evaluó el efecto del trasplante de neuronas funcionales y células gliales obtenidas de animales sanos adultos a un modelo de la enfermedad de Parkinson en rata macho de la cepa Wistar durante dos semanas.

Trabajos anteriores con células adultas han demostrado la mejoría de los síntomas clínicos en pacientes con la EP que recibieron trasplante de células de su propia médula adrenal (Backlund *et al.*, 1985), y por otro lado Muraoka y colaboradores en 2008 concluyeron que NSCs adultas tienen una tendencia a presentar mejoría en el comportamiento lo que sugiere que las células adultas son una buena alternativa de fuente celular. Además, hay que considerar que las células de origen embrionario por sus propiedades de auto-renovación y estado de diferenciación pueden promover la formación de tumores en el sitio de trasplante (Ben-David y Benvenisty, 2011). De este modo, el uso de células madre embrionarias y de células de neonatos pueden ser descritas como "armas de doble filo", ya que sus características definitorias hacen que a la vez sean peligrosas (Ben-David y Benvenisty, 2011) y por lo tanto, dificultan su potencial clínico. Otro aspecto importante a considerar es la funcionalidad de las células a trasplantar, ya que se han realizado trabajos en donde se observa que las células de origen embrionario tienen una inmadurez funcional (Carson *et al.*, 1998; Santambrogio *et al.*, 2001; Von Bernhardi *et al.*, 2011).

Para el análisis del modelo de la EP y las consecuencias funcionales del trasplante se recomienda que la lesión inducida con la neurotoxina 6-OHDA se

realice de forma unilateral debido a que las inyecciones bilaterales inducen adipsia y afagia (Winkler *et al.*, 2000) que promueven una elevada mortalidad del modelo (Iancu *et al.*, 2005).

La neurotoxina 6-OHDA es usualmente inyectada en los siguientes sitios: la SN, MFB, ST y en VTA cada uno de estos modelos presentan ciertas características que tienen que ser tomadas en cuenta. En este caso se eligió la administración de 6-OHDA en la SN debido a que produce una rápida lesión de la vía nigroestriada, que tarda en ocurrir de 2-3 días en comparación con su administración en ST el cual requiere hasta 3 semanas (Tieu *et al.*, 2013).

Es bien conocido que el daño generado por la neurotoxina 6-OHDA, afecta a neuronas catecolaminérgicas entre ellas las dopaminérgicas, debido, a la alta afinidad que tiene la neurotoxina por el transportador de dopamina (DAT) (Casteels *et al.*, 2007). Una vez en el interior de las neuronas dopaminérgicas puede por una parte inhibir complejo 1 de la cadena electrónica mitocondrial con lo que se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) lo que eventualmente puede provocar el daño de biomoléculas, además provoca la disminución de ATP generando un déficit energético y por último la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y quinonas productos de su metabolización (Luquin, 2010). El daño a biomoléculas por el incremento de EROS activa a diversas vías de señalización que conducen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas principalmente por apoptosis (Lotharius *et al.*, 1999) y autofagia (Fei *et al.*, 2009).

Independientemente del sitio de administración, la muerte de las neuronas dopaminérgicas provocan la disminución de DA en el ST que fue lesionado con la neurotoxina 6-OHDA (Tieu *et al.*, 2013). Una de las ventajas de un modelo de lesión unilateral por la inyección de 6-OHDA es que un mismo animal lesionado puede ser su propio control, lo cual nos permite el análisis de comportamiento debido a que se realiza la comparación del hemisferio lesionado vs el hemisferio intacto (Winkler *et al.*, 2000). Las neuronas dopaminérgicas regulan los impulsos que emite el ST, a través de la vía directa (excitadora) e indirecta (inhibitoria). En condiciones normales y de movimiento la DA va a favorecer la vía directa acentuando el estímulo tálamocortical y con ello facilitando el inicio y ejecución de movimientos. Mientras que la falta de DA en el ST promueve la vía indirecta, inhibe el estímulo tálamocortical e impide el inicio de movimientos voluntarios (Vargas, 2005; Kiernan, 2009; Micheli y Fernández, 2010). Las lesiones generadas con la neurotoxina 6-OHDA pueden ser completas en donde se observa una denervación de neuronas DA del 90-95% modelo que simula etapas avanzadas de la enfermedad. Y la lesión parcial en donde la denervación dopaminérgica es < 90% y que representa a un modelo de la EP en etapas tempranas (Winkler *et al.*, 2000).

Para comprobar el grado de lesión inducido por la neurotoxina 6-OHDA en el modelo animal de la EP y el grado de mejoría establecido por el trasplante de células se realizaron pruebas de comportamiento. Existen varias pruebas para evaluar las modificaciones conductuales en el modelo, en dos de ellas se administran fármacos: la prueba de rotación en respuesta a la apomorfina y la prueba de rotación en

respuesta a la D-anfetamina, sin embargo, también hay pruebas libres de fármacos como las siguientes: la escalera, campo abierto, cilindro, etc. (Blesa *et al.*, 2012). Las pruebas de rotación en respuesta a los fármacos son las comúnmente utilizadas por su especificidad (Blesa *et al.*, 2012; Tieu, 2013). La apomorfina es un agonista dopaminérgico que produce giros contralaterales al sitio de lesión cuando es administrada a un modelo de la enfermedad de Parkinson (Tieu, 2013). En el presente trabajo se hizo la prueba de rotación en respuesta a la apomorfina, sin embargo, no fue posible observar la conducta de giro. Una de las dificultades que se tuvo al aplicar la prueba de rotación inducida por apomorfina fue la variabilidad con respecto a la dosis administrada (Zhu *et al.*, 2009; Yasura *et al.*, 2006; Hargus *et al.*, 2010), tratándose de abordar este problema se decidió hacer una curva dosis respuesta, sin obtener resultados. Otro motivo que posiblemente influyó a no tener una conducta de giro después de la administración de apomorfina fue que la denervación dopaminérgica no fue superior al 90%, como menciona la literatura que tiene que ser (Blesa *et al.*, 2012). Esto se debe a la dificultad que representa el lesionar la SN debido a que es una estructura de pequeña dimensión en comparación con otros sitios de lesión como el ST y el VTA (Blesa *et al.*, 2012). Es indispensable que para posteriores estudios, se modifiquen los sitios de lesión y/o aumentar la concentración de la neurotoxina para garantizar modelos de la EP con una lesión completa. Además, es necesario establecer en el laboratorio las pruebas de rotación en respuesta a la apomorfina o anfetamina para determinar el grado de lesión nigroestriatal o mejoría establecida producto del trasplante de neuronas y

células gliales, debido a que estas pruebas permiten realizar comparaciones sobre la eficacia de protocolos de lesión y trasplantes.

Debido a las dificultades para realizar la prueba de rotación inducida por apomorfina fue necesario recurrir a pruebas alternativas mencionadas ya en la metodología y que se detallaran a continuación. El mecanismo involucrado en la respuesta de elevación corporal, se sugiere sea por el estrés que se genera en el animal al ser tomado de la base de la cola y elevarlo, estas acciones provocan la liberación de DA en el ST y dado que hay un desequilibrio en los niveles de DA de ambos hemisferios se puede explicar la actividad de una marcada elevación corporal hacia un hemisferio preferentemente (Yuan *et al.*, 2005). Borlongan y Sanberg (1995) propusieron esta prueba y observaron que el porcentaje de elevaciones corporales en su modelo de ratas denervadas de neuronas DA en la SN tuvo un aumento significativo en el porcentaje de elevaciones corporales hacia un hemisferio, la asimetría de elevaciones corporales presentó una ligera disminución después de dos meses, sin embargo, siguió siendo evidente. Mientras que Yuan y colaboradores en el 2005 determinaron que en un modelo de Parkinson obtenido de la lesión en el VTA y MFB hay un incremento moderado en las elevaciones corporales después de 5 semanas de haber sido lesionadas, que se asocia a una disminución del 50-60% de inmunotinción a TH. Sin embargo, la asimetría de elevaciones corporales no es tan drástico como en el modelo de Parkinson obtenido por la lesión en la SN. En la prueba de elevación corporal del presente trabajo se observó un incremento en el porcentaje de elevaciones en el grupo de ratas lesionadas de forma unilateral en la

SN con la neurotoxina 6-OHDA ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, durante las cuatro semanas siguientes a la cirugía de lesión. Se observó que las ratas que recibieron el trasplante de neuronas y células gliales obtenidas de ratas adultas sanas promueven una disminución significativa en el porcentaje de elevaciones corporales ($p < 0.05$), lo que sugiere que el trasplante promueve una mejoría para este tipo de conducta y que los animales lesionados trasplantados probablemente presentan una parcial reinervación dopaminérgica, que habría que demostrarse.

La lesión unilateral promovida por la neurotoxina 6-OHDA provoca un déficit crónico en las funciones sensomotoras y somatosensoriales en las extremidades contralaterales a la lesión, lo cual tiene como consecuencia el aumento del uso de la extremidad anterior ipsilateral a la zona de lesión (Araújo *et al.*, 2013). El uso de la extremidad anterior ipsilateral a la lesión se puede observar en animales con una denervación 50% de neuronas DA (Winkler *et al.*, 2000). La prueba de cilindro es usada para evaluar la actividad motora fina, en esta prueba los animales controles (sanos) utilizaban ambas extremidades anteriores para explorar el cilindro, mientras que los animales lesionados de forma unilateral con la neurotoxina 6-OHDA en el hemisferio izquierdo incrementan de forma significativa el porcentaje de toques al cilindro con la extremidad anterior izquierda ($p < 0.05$) con respecto a los controles. Decresaac y colaboradores en 2012 determinaron que la asimetría para un modelo de la enfermedad de Parkinson con lesión parcial en el ST después de 8 semanas presentó un aumento moderado de toques con la extremidad anterior ipsilateral a la zona de lesión, por lo que la asimetría en el uso de las extremidades anteriores

indican un deterioro de la SN (Przybyszewski *et al.*, 2006). Después de realizar el trasplante de neuronas y células gliales el porcentaje de toques con la extremidad izquierda muestra una tendencia a disminuir, de modo que se produce una moderada recuperación de la actividad motora final, estos resultados son consistentes con la probable reinervación de la zona.

En la prueba de campo abierto se mide la actividad locomotora que depende de las habilidades motoras y de la motivación exploratoria del animal (Carvalho *et al.*, 2013). Los animales con lesión unilateral en la SN con la neurotoxina 6-OHDA muestran una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad motora en la prueba de campo abierto, resultados que se correlacionan con los obtenidos por Carvalho y colaboradores en 2013 donde muestran que el modelo de la enfermedad de Parkinson con lesión en MFB tiene una disminución en la actividad locomotora que se encuentra asociada a una reducción de la inmunoreactividad a TH del 70%. Los animales que recibieron el trasplante de neuronas y de células gliales presentaron un incremento de la actividad locomotora que es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con el grupo lesionado, por lo que el trasplante de neuronas y células gliales promueve la mejoría de la actividad locomotora.

Para verificar si la mejoría conductual se debe al trasplante de células realizado o al proceso de recuperación del animal, se realizó la lesión con la neurotoxina 6-OHDA a un grupo de animales que fueron evaluados conductualmente durante 8 semanas, nuestros resultados muestran que el efecto máximo de lesión se mantiene hasta la 4 semana y para la semana 6 y 8 hay una ligera disminución del

déficit motor para cada una de las pruebas. Al comparar la disminución del déficit motor en cada una de las pruebas el grupo de ejemplares lesionados no trasplantados y trasplantados muestran una diferencia, ya que en el grupo de lesionados con trasplante se observó una rápida y marcada tendencia a la reducción del déficit motor en cada una de las pruebas. La recuperación del déficit motor a través del tiempo puede atribuirse a la neurogénesis que existe en el cerebro adulto sano, debido a que los nichos neurogénicos ubicados en el hipocampo y en la zona subventricular ayudan a mantener un número constante de células reponiendo a las células muertas o dañadas (Muraoka *et al.*, 2008; Enciu *et al.*, 2011). Sin embargo la recuperación observada es parcial, posiblemente se deba a que la pérdida de DA de la vía nigroestriada por un efecto indirecto produce una reducción la proliferación de las NSCs (Hoglinger *et al.*, 2004; O'Keeffe *et al.*, 2009) y el grado de reducción en la proliferación de las NSCs es directamente proporcional al grado de denervación de neuronas DA (Baker *et al.*, 2004; O'Keeffe *et al.*, 2009).

En cuanto a las características histológicas de los cerebros, en la SN del grupo control se determinó que hay una mayor densidad de células gliales con respecto a las neuronas en una relación 7:1, sin embargo, la relación descrita en la literatura de ganglios basales, diencéfalo y tallo cerebral es 11:1 (Lent *et al.*, 2012). No es la misma relación, posiblemente se debe a los demás constituyentes de ganglios basales (ST y el núcleo subtalámico) cuya composición pueda modificar esta relación, otra variable es la forma en que se cuantifican los tipos celulares que también puede provocar que haya diferencias en las proporciones celulares. Sin

embargo, a pesar de estas diferencias se aprecia que hay una mayor densidad de células gliales. Posiblemente por el papel fundamental que tienen en la modulación de los circuitos neuronales y por su contribución al inicio y/o mantenimiento del movimiento corporal (Azevedo *et al.*, 2009; Lent *et al.*, 2012). En este sentido los astrocitos presentan en su membrana plasmática canales iónicos (K⁺, Ca²⁺ y Na⁺), proteínas de uniones GAP (Cx43, Cx26 y Cx 30) y receptores para neurotransmisores (ATP, GABA, glicina, acetilcolina, serotonina y dopamina), información que conduce a pensar en la existencia de sinapsis tripartitas; es decir, la comunicación directa entre neurona pre y postsináptica y astrocitos. En este tipo de sinapsis, los astrocitos reciben y procesan la información procedente de las neuronas presinápticas y modulan la transmisión de la neurona postsináptica. La consecuencia fisiológica de esta comunicación puede ser esencial para la regulación del movimiento (Christensen *et al.*, 2013).

Posteriormente se calculó el porcentaje de neuronas en los grupos control, control de lesión y el grupo lesionado unilateralmente con la neurotoxina 6-OHDA y se observó una disminución en el porcentaje de neuronas del grupo lesionado con respecto al grupo control 43%, dato que es congruente con la denervación dopaminérgica (aproximadamente de un 50%) que explica los cambios en las pruebas conductuales (Winkler *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que el modelo generado en este trabajo representa una lesión parcial. A pesar de estos resultados aún es necesario determinar el grado de denervación dopaminérgica de forma más específica del modelo de la enfermedad

de Parkinson, a través de una inmunotinción para TH enzima limitante en la síntesis de dopamina (Tieu, 2013).

La densidad celular total observada en el grupo lesionado con la neurotoxina 6-OHDA en la SN es mayor en comparación con el grupo control. Como presentamos en los resultados la relación célula glial/neurona en el modelo de la EP aumento a 13:1. Probablemente se debe al aumento en la presencia de células gliales como consecuencia del daño mecánico producido por la inyección y el daño químico producido por la neurotoxina 6-OHDA (Wachter *et al.*, 2010). Anteriormente se ha demostrado que en modelos de la EP con lesión en la SN, VTA y MFB por la neurotoxina 6-OHDA hay una migración de las células gliales hacia el sitio de lesión (Wulner y Klockgether, 2003; Henning *et al.*, 2008). En el caso particular de los astrocitos, estos tienen dos fuentes de procedencia 1) por la desdiferenciación de los astrocitos residentes después de la administración intraventricular de 6-OHDA y 2) la proliferación de las células gliales progenitoras de la zona subventricular y en el giro dentado (Chojnacki *et al.*, 2009) y su posterior migración hacia el sitio lesionado (Yan *et al.*, 2009).

Las células gliales después de 4 semanas de la cirugía de lesión con la neurotoxina 6-OHDA no muestran características morfológicas de estar activadas.

Se trasplantaron 20,000 células disueltas en 1 μ l de medio, el número de células trasplantadas fue determinado por la cantidad de células disponibles, sin embargo en diversos trabajos superan por mucho la cantidad de células trasplantadas (Hargus *et al.*, 2010; Muraoka *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009) que va de

100, 000 a 250, 000 células en cada sitio de trasplante. La mejoría del modelo animal depende de la supervivencia de las células trasplantadas, lo cual a su vez depende de las células trasplantas y de su tasa de supervivencia. La tasa de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas al procedimiento de trasplante es conocido va 5-20% (Barlett *et al.*, 2004). Con respecto a la cantidad de células Barlett y colaboradores en 2004 demostró que los trasplantes de células en los que se depositaron 50,000 células mostraban la misma eficiencia funcional que los trasplantes de células en los que se había depositado 100,000 células y 400,000 células, también demostró que los ejemplares en los que se depositaron 50,000 células hay un incremento del porcentaje de células positivas a TH en el sitio de trasplante, de crecimiento axonal y la producción de dopamina.

Todos los animales con trasplante de neuronas y células gliales sobrevivieron a las dos semanas de haberse realizado el trasplante, excepto uno que murió durante la cirugía de trasplante. Los sitios de trasplantes fueron identificados fácilmente en todos los casos. Hay una gran densidad de células que se encuentran dispersas a lo largo del trayecto de la aguja y en el sitio de trasplante (véase Fig. 17, 18 y 19). Se cuantificaron las células presentes en el grupo control, control de trasplante y en el de trasplante. Se determinó que no hay un incremento significativo en la densidad celular del grupo control de trasplante en comparación al que recibió el trasplante, el cual se observó duplicó su densidad celular en comparación al grupo control ($p < 0.05$), lo que sugiere que las células sobrevivieron al trasplante en los tres sitios de trasplante. Se observa una gran cantidad de células con una forma

ameboide en el grupo que recibió el trasplante, fenotipo que caracteriza a la microglía activa (Liu y Hong, 2002). La microglía activa puede secretar numerosos factores solubles que pueden ser potencialmente benéficos o perjudiciales para la supervivencia de las neuronas trasplantadas (Streit *et al.*, 1999; Liu y Hong, 2002). En el sitio de trasplante no se pueden identificar la presencia de neuronas con una morfología típica, pero se observan grandes cuerpos celulares con forma alargada, sin embargo, es necesario que se realice posteriormente una identificación específica para detectar la presencia y cantidad de neuronas y células gliales supervivientes al trasplante, la identificación de neuronas dopaminérgicas en el sitio de trasplante se puede hacer con una doble inmunotinción para Neum (marcador de neuronas) y TH.

El análisis del trasplante de neuronas y células gliales a un modelo de la EP muestra la supervivencia de las células trasplantadas, y la evaluación de la conducta motora refleja una mejoría después de haberse realizado el trasplante de células, datos que sugieren una reinervación dopaminérgica promovida posiblemente por la supervivencia de neuronas en los sitios de trasplante. Previamente se ha reportado que aunque la supervivencia de células dopaminérgicas en el sitio de trasplante sea relativamente pequeño la dopamina es un neurotransmisor que difunde con facilidad a través del parénquima cerebral y es capaz de llegar a sus receptores postsinápticos resultando en una adecuada modulación del movimiento (Barlett *et al.*, 2004). Por otro lado, los múltiples sitios de depósito y los sitios elegidos garantizan que células que sobrevivieron a la cirugía de trasplante y que producen DA se

encuentre cerca de los receptores postsinápticos (Thompson *et al.*, 2009) permitiendo que haya una reinervación aún más completa (Winkler *et al.*, 2000).

El papel que desempeñen las células gliales trasplantadas es de vital importancia para el éxito que pueda representar esta alternativa terapéutica ya que pueden promover la síntesis de factores como: BDNF, VEGF, FGF, IGF1, NGF, TGF, GDNF que favorezcan tanto la supervivencia de las células, desarrollo y crecimiento de las proyecciones axonales, además, pueden proporcionar energía a la neuronas y ayudar a mantener la homeostasis iónica del espacio extracelular. Sin embargo, también pueden tener un efecto perjudicial para el organismo receptor ya que es bien conocido que son capaces de secretar citocinas proinflamatorias que pueda desembocar en un daño hacia las células trasplantadas y a las células residentes (Teismann y Schulz, 2004).

Los resultados benéficos sugieren que los trasplantes de células son una buena alternativa terapéutica para un modelo de la EP con una lesión parcial y que representa etapas tempranas de la EP, lo anterior nos hace pensar en la aplicación de la terapia celular para pacientes con EP en etapas tempranas. Actualmente en la clínica los candidatos elegidos para recibir un trasplante son aquellos pacientes que se encuentran en etapas avanzadas de la EP.

11 Conclusiones

Las neuronas y células gliales obtenidas de la sustancia nigra de ratas adultas sanas trasplantadas al cerebro medio de un modelo de la enfermedad de Parkinson posiblemente promovió una parcial reinervación dopaminérgica y con ello produjo la mejoría conductual.

El modelo generado de la lesión unilateral con la neurotoxina 6-OHDA nos permite realizar evaluaciones usando a cada ejemplar como su propio control. El modelo generado de la enfermedad de Parkinson en ratas macho de la cepa Wistar presenta una lesión parcial, el cual fue determinado a través del conteo de neuronas presentes en el sitio de lesión.

El procedimiento de trasplante en general fue exitoso, sin embargo aún necesita mejorar en ciertos aspectos como: utilizar una pipeta de vidrio para hacer el depósito de células, añadir un segundo control de trasplante que nos permita discernir que la acumulación de células en el sitio de trasplante se deba a la presencia de células gliales y su activación por células muertas presentes en el medio depositado.

Se observa una gran densidad de células presentes en el sitio de trasplante que sugiere que neuronas y células gliales obtenidas de la *sustancia nigra* de ratas adultas sanas sobreviven a las dos semanas después de haberse realizado el trasplante, resultados que se correlacionan con la mejoría de la conducta motora de forma significativa en por lo menos dos pruebas conductuales.

El trasplante de neuronas y células gliales sugiere ser una buena alternativa terapéutica para la enfermedad de Parkinson.

12 Prospectivas

Dado que para el año 2050 habrá 36 millones de personas por arriba de los 60 años (Guevara, 2010) y considerando que el principal factor de riesgo para padecer la EP es el envejecimiento, es necesario el desarrollo de investigaciones asociadas a la mejora de las terapias celulares.

Se recomienda realizar nuevos estudios con un modelo de la enfermedad de Parkinson sujeto a la prueba de rotación inducida por apomorfina o anfetamina. Además es conveniente realizar la evaluación del efecto de trasplante de neuronas y células gliales a un modelo de la enfermedad de Parkinson al menos 4 meses para determinar si la mejoría producida es perdurable. Es necesario cuantificar de forma específica el porcentaje de neuronas y células gliales trasplantadas, así como el de las células supervivientes en el sitio de trasplante. Se recomienda verificar si las células trasplantadas establecen interacciones celulares con las células del huésped y la síntesis de dopamina por parte de las neuronas implantadas

13 Referencias

Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M.T., Michel P.P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C. & Agid Y. 1997. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 1:25-31.

Alarcón A. A., Santamaría A. & Königsberg F. M. 2010. Modelos Neurotóxicos de la Enfermedad de Parkinson y Disfunción Mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica UNAM*, vol. 29, núm. 3. 92-100

Antigüedad Z. A. R. & Terrassa S. C. 2004. Trastornos neurodegenerativos. Dossier. España. 19-21.

Araújo D.P., De Sousa C.N., Araújo P.V., Menezes C.E., Sousa Rodrigues F.T., Escudeiro S.S., Lima N.B., Patrocínio M.C., Aguiar L.M., Viana G.S. & Vasconcelos S.M. 2013. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic Acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-ohda in rat. *Evid Based Complement Alternat Med.*; 571378

Arias-Carrión O. & Drucker-Colín R. 2007. Neurogénesis como estrategia terapéutica para regenerar el sistema nervioso central. *Rev Neurol*; 45 (12): 739-745.

Arias-Carrión O. 2008. Terapia celular para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson. *Rev Med Univ Navarra*; 52 (2): 17-24.

Azevedo F., Carvalho R.B., Grinberg L.T., Farfel J.M., Ferretti R.E.L., Leite R.E.P., Jacob-Filho W., Lent R. & Herculano-Houzel S. 2009 Equal numbers of neuronal and non-neuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol*; 513, 532–541.

Baker S.A., Baker K.A. & Hagg T. 2004. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci.*;20:575–579.

Bartlett L.E., Sadi D., Lewington M. & Mendez I. 2004. Functional improvement with low-dose dopaminergic grafts in hemiparkinsonian rats. *Neurosurgery*; 405-12.

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. First clinical trials. *J.Neurosurg*; 62, (2) 169-173

Ben-David U. & Benvenisty N. 2011. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat.Rev.Cancer*; 11, (4) 268-277.

Bjorklund L.M. 2004. Stem cell therapy for Parkinson's disease. *Dialogues.Clin.Neurosci*; 6, (3) 303-311.

Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I.Y., McNaught K.S., Brownell A.L., Jenkins B.G., Wahlestedt C., Kim K.S. & Isacson O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 99, 2344-2349.

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

Borlongan C.V. & Sanberg P.R. 1995. Elevated body swing test: a new behavioral parameter for rats with 6-OHDA induced hemiparkinsonism. *Neuroscience*; 15(7): 5372-5378.

Bové J. & Perier C. 2012. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*; 211:51-76.

Breydo L., Wu J.W. & Uversky V.N. 2012. Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim.Biophys.Acta*; 1822, (2) 261-285.

Brundin P., Li J.Y., Holton J.L., Lindvall O. & Revesz T. 2008. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nat. Rev. Neurosci.*; 9, 741-745.

Carson M.J., Reilly C.R., Sutcliffe J.G. & Lo D. 1998. Mature microglia resemble immature antigenpresenting cells. *Glia*; 22:72-85.

Carvalho M.M., Campos F.L., Coimbra B., Pêgo J.M., Rodrigues C., Lima R., Rodrigues A.J., Sousa N. & Salgado A.J. 2013. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener.*; 8:14

Casteels C., Lauwers E., Bormans G., Baekelandt V. & Van Laere K. 2007. Metabolic-dopaminergic mapping of the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*; 35(1):124-34.

Cetra F. 2011. Efecto de las neurotrofinas de alto peso molecular en una línea celular de motoneuronas. Universidad de la República de Uruguay.

Chadi G., Maximino J.R. & Oliveira G.P. 2009. The importance of molecular histology to study glial influence on neurodegenerative disorders. Focus on recent developed single cell laser microdissection. *J. Mol. Histol.*; 40, 241-250.

Chojnacki A.K., Mak G.K. & Weiss S. 2009. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?. *Nat Rev Neurosci.*;153-63.

Christensen R.K., Petersen A.V. & Perrier J.F. 2013. How do glial cells contribute to motor control. *Curr Pharm Des.* 4385-99.

Coskun P., Wyrembak J., Schriener S.E., Chen H.W., Marciniack C., Laferla F., & Wallace D.C. 2012. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim. Biophys. Acta*; 1820, (5) 553-564.

Decressac M., Mattsson B. & Björklund A. 2012. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.*; 306-15.

De Vente J., Van Muiswinkel F. L., Steinbusch W.M. & Dukarch B. 1994. Identification of NO-producing and receptive Cells in Mesencephalic Transplants in a Rat Model of Parkinson's Disease: A Study Using NADPH-d Enzyme- and NOS,/cGMP Immunocytochemistry. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 738, 291–304.

Dekkers M.P., Nikolettou V. & Barde Y.A. 2013. Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. *J Cell Biol.*; 203(3):385-93.

Drucker-Colín R., Durán-Vázquez A., Salín-Pascual R.J., Verdugo-Díaz L., Mendoza-Ramírez J.L. & Jiménez-Anguiano A. 1996. Rapid eye movement (REM) sleep deprivation in 6-OHDA nigro-striatal lesioned rats with and without transplants of dissociated chromaffin cells. *Brain Res.* Aug 12;729(2):170-5.

Enciu M.A., Nicolescu M.I., Manole G.C., Muresanu D.F. & Pospescu L.M. 2011. Neurodegeneration in neurodegenerative disorders. *BMC Neurology.* 11:75.

Pérez S. E. 2007. Viaje al universo neuronal. Fundación Española para la ciencia y tecnología. División de impresión. 277.

Evans K. B., Singer G. S. A., & Burnstock. 1974. Intracranial injection of drugs: comparison of diffusion of 6-OHDA and Guanethidine. *Pharm Biochemistry.*; 205-217.

Fei X.F., Qin Z.H., Xiang B., Li L.Y., Han F., Fukunaga K. & Liang ZQ. 2009. Olomoucine inhibits cathepsin L nuclear translocation, activates autophagy and attenuates toxicity of 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 85-97.

Finn-Geneser. 2000. *Histología.* Editorial Médica Panamericana. 3 edición. 334,35,36,37.

Franklin R.J.M., Fawcett J.W., Rosser A.E. & Dunnett S.B. 2012. Glial transplantation. Oxford Scholarship Online; 10.1093.

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*. 351-2

Fukuda H., Takahashi J., Watanabe K., Hayashi H., Morizane A., Koyanagi M., Sasai Y. & Hashimoto N. 2006. Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells*; 24, (3) 763-771.

García-Marín V., García-López P. & Freire M. 2007. Cajal's contribution to glia research. *Neurosci.*; 479-487.

Guevara F. J. 2010. La enfermedad de Alzheimer. Boletín división de Investigación. Departamento de Bioquímica, UNAM.

Hahn M., Timmer M. & Nikkhah G. 2009. Survival and early functional integration of dopaminergic progenitor cells following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *J.Neurosci.Res.*; 87, (9) 2006-2019.

Halliday G.M. & Stevens C.H., 2011. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*; 26, 6-17.

Hardy J. & Gwinn-Hardy K. 1998. Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science*; 282, (5391) 1075-1079.

Hargus G., Cooper O., Deleidi M., Levy A., Lee K., Marlow E., Yow A., Soldner F., Hockemeyer D., Hallett P.J., Osborn T., Jaenisch R. & Isacson O. 2010. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(36):15921-6.

Hartmann A. 2004. Postmortem studies in Parkinson's disease. *Dialogues Clin Neurosci.*; 6(3): 281–293.

Henning J., Strauss U., Wree A., Gimsa J., Rolfs A., Benecke R. & Gimsa U. 2008. Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neurosci Res*. 246-53.

Hernández Castillo J. R. 2013. Obtención y caracterización de co-cultivos de células nerviosas y gliales adultas de la Sustancia Nigra. Universidad Autónoma Metropolitana.

Höglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.H., Caille I. & Hirsch EC. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 7(7):726-35.

Iancu R., Mohapel P., Brundin P. & Paul G. 2005. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav. Brain Res.*; 162(1):1-10.

Isacson O., Bjorklund L.M. & Schumacher J.M. 2003. Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann. Neurol.*; 3, S135-S146.

Jackson-Lewis V., Blesa J. & Przedborski S. 2012. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*; 1:S183-5.

Juri C.C., Rodríguez-Oroz Ma. & Obeso J. 2005. Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson en Estadio Inicial. Universidad de Navarra, España.

Kramer BC and Mytilineou C. 2004. Alterations in the cellular distribution of bcl-2, bcl-x and bax in the adult rat substantia nigra following striatal 6-hydroxydopamine lesions. *J Neurocytol.*;213-23.

Kandel E.R., Schwartz J.H. & Jessell T.M. 2000. Principles of neuronal science. USA: Editorial McGraw-Hill .

Kiernan & John A. 2009. Barr El Sistema Nervioso Humano: Una Perspectiva Anatómica. Editor Lippincott Williams & Wilkins. 9 edición. 446.

Kiristioglu I., Dogruyol H., & Cavusoglu I. 1999. Long-term outcome of the fetal adrenal gland transplantation in rats. *Eur.J.Pediatr.Surg.*; 9, (6) 400-405

Ko J.Y., Lee H.S., Park C.H., Koh H.C., Lee Y.S. & Lee S.H., 2009. Conditions for tumor-free and dopamine neuron-enriched grafts after transplanting human ES cell-derived neural precursor cells. *Mol. Ther.*; 17, 1761-1770.

Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A., Olanow C.W. & Freeman T.B. 2008. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov. Disord.*; 23, 2303-2306.

Lee K.H., Yoon D.H., Park Y.G. & Lee B.H. 2005. Effects of glial transplantation on functional recovery following acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma*; 22(5):575-89.

Lent R., Azevedo F.A., Andrade-Moraes C.H. & Pinto A.V. 2012. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *Eur J Neurosci.*; 35(1):1-9.

Lepore A.C., O'Donnell J., Kim A.S., Williams T., Tuteja A., Rao M.S., Kelley L.L., Campanelli J.T. & Maragakis N.J. 2011. Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS. *PLoS One*; 6(10):e25968.

Levy O.A., Malagelada C. & Greene L.A. 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *J. Apoptosis*; (4):478-500.

Liu B, Hong JS. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther.*; 304(1):1-7.

Liu R., Gao X., Lu Y. & Chen H. 2011. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology*; 76, 2002-2009.

Lotharius J., Dugan L.L. & O'Malley K.L. 1999. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J. Neurosci.*; 15;19(4):1284-93.

Luquin Ma. R. 2010. Modelos Experimentales de la Enfermedad de Parkinson. Universidad de Navarra, España.

Martin J.L., Brown A.L. & Balkowiec A. 2012. Glia determine the course of brain-derived neurotrophic factor-mediated dendritogenesis and provide a soluble inhibitory cue to dendritic growth in the brainstem. *Neuroscience*; 207, 333-346.

Matyash V. & Kettenmann H. 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.*; 63(1-2).

Merello M. & Cammarota A. 2007. Anatomía funcional de los ganglios basales. Instituto de Investigaciones Neurológicas. Buenos Aires, Argentina.

Micheli F. & Fernández M. 2010. Neurología. Medica Panamericana. 2 edición. 556.

Muraoka K., Shingo T., Yasuhara T., Kameda M., Yuen W.J., Uozumi T., Matsui T., Miyoshi Y. & Date I. 2008. Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease. *J.Neurosurg.*; 108, 149-159.

Nualart-Marti A., Solsona C., & Fields R.D. 2012. Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim.Biophys.*

O'Keefe G.C., Tyers P., Aarsland D., Dalley J.W., Barker R.A. & Caldwell M.A. 2009. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci.*; 26;106.

Pawitan J.A. 2011. Prospect of cell therapy for Parkinson's disease. *Anat.Cell Biol.*; 44, (4) 256-264.

Paxinos G. & Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic*. 6th ed. Ac. Press. N.Y. 456.

Przybyszewski A.W., Sosale S. & Chaudhuri A. 2006. Quantification of three-dimensional exploration in the cylinder test by the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Behav Brain Res* 170:62-70.

Santambrogio L., Belyanskaya S.L., Fischer F.R., Cipriani B., Brosnan C.F. & Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 98:6295–300.

Schapira A.H., 2009. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurol. Clin.*; 27, 583-603.

Segura T., Galindo M. F., Rallo-Gutierrez B., Ceña V. & Jordan J. 2003. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev. Neurol.*; 36 (11) 1047-1057.

Streit W.J., Walter S.A. & Pennell N.A. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*; 57 563–581

Teismann P. and Schulz J.B. 2004. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res.*; 318: 149-161.

Sidoryk-Wegrzynowicz M., Wegrzynowicz M., Lee E, Bowman A.B. & Aschner M. 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol. Pathol.*; 39(1):115-23.

Thompson L.H, Grealish S., Kirik D. & Björklund A. 2009. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur. J. Neurosci.*; 30(4):625-38.

Tieu K. 2013. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Perspect Med.*;10.1101.

Trujillo B.R., Flores G. & Arias-Montaña A. 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev. Biomed.* 11:39-60.

Vargas B. M. 2005. Enfermedad de Parkinson y la Dopamina. *Synapsis vol.2*. Sociedad Universitaria de Neurociencias.

Von B.R., Tichauer J. & Eugenin-von B.L. 2011. Proliferating culture of aged microglia for the study of neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Methods*; 202, (1) 65-69.

Wachter B., Schürger S. & Rolinger J., Von Ameln-Mayerhofer A., Berg D., Wagner H.J. & Kueppers E. 2010. Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell Tissue Res.*; 342(2):147-60.

Walker H. R., Moore C. Davies G., B. L., Koch R. J. & Meshul C. K. 2012. Effects of Subthalamic Nucleus Lesions and Stimulation upon Corticostriatal Afferents in the 6-OHDA-Lesioned Rat. *PLoS One.*; 7(3): e32919.

Welchko R.M., Leveque X.T. & Dunbar G.L. 2012. Genetic rat models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.*; 128356.

Winkler C., Kirik D., Bjorklund A. & Dunnett S. B. 2000. Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. *Brain Reserch*; 127.

Wullner U. & Klockgether T. 2003. Inflammation in Parkinson's disease. *Neurology J.*; 250.

Xuan A.G., Luo M., Ji W.D. & Long D.H. 2009. Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer's disease rats. *Neurosci. Lett.*; 450(2):167-71.

Yan Y.P., Lang B.T., Vemuganti R. & Dempsey. R.J. 2009. Persistent migration of neuroblasts from the subventricular zone to the injured striatum mediated by osteopontin following intracerebral hemorrhage. *J. Neurochem.* 109(6):1624-35.

Yasuhara T., Matsukawa N., Hara K., Yu G., Xu L., Maki M., Kim S.U. & Borlongan C.V. 2006. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 26(48):12497-511.

Yuan H., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y. 2005. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*; 144(1):35-45.

Zhu Q., Ma J., Yu L. & Yuan C. 2009. Grafted neural stem cells migrate to substantia nigra and improve behavior in Parkinsonian rats. *Neurosci.Lett.*; 462, (3) 213-218.

13.1 Páginas Web

1. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010). [On line].

Disponible en:

<http://cuentame.inegi.org.mx>

2. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). (2010).

National Institutes of the Health. [On line]. Disponible en:

http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm

3. 21st Century Science, Technology, and Medical News. (CSTMN).

(2012). Quantum Day. [On line]. Disponible en:

<http://www.quantumday.com/2012/11/repairing-spinal-cord-injuries-through.html>

14 Anexos

14.1 Anexos de la metodología

14.1.1 Preparación de 6-OHDA

Se pesó 20 mg de ácido ascórbico y se disolvieron en 10 ml de solución salina. Después se tomó de esta solución 2 ml y se añadió 4 mg de 6-OHDA. Posteriormente se alícuota esta solución en un volumen de 5 ul totales. A cada animal se inyectó un volumen de 4 ul a una velocidad de 1 ul por minuto. Las alícuotas se mantuvieron a -60 °C hasta su uso.

14.1.2 Preparación de medio neurobasal

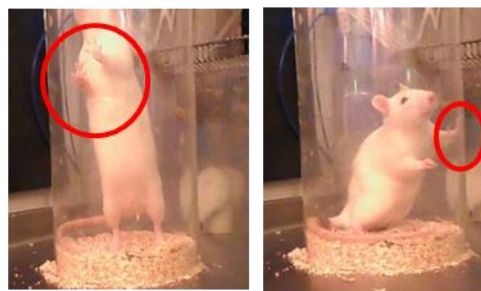
Se midió 44 ml de medio neurobasal al cual se añadió 5 ml de suero fetal bovino, 0.5 ml de L- glutamina y 0.5 ml de anti-anti.

14.1.3 Galería de fotos de pruebas conductuales

Cilindro



Se coloca a la rata en un cilindro transparente .



Se evalúa el número de toques con las extremidades delanteras

Fig. 20. Prueba de elevación corporal.

Se tomó a la rata de la base de la cola y se evaluó la frecuencia de elevaciones corporales a cada uno de los hemisferios.

Elevación corporal

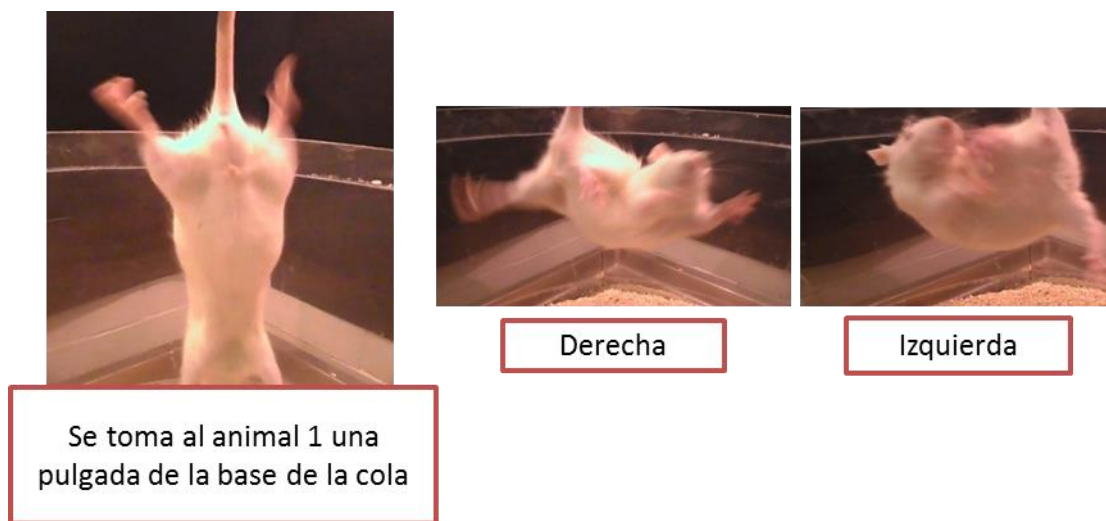


Fig. 21. Prueba de elevación corporal.

Se tomó a la rata de la base de la cola y se evaluó la frecuencia de elevaciones corporales a cada uno de los hemisferios.

Campo abierto



Fig. 22. Campo abierto

Se tomó a la rata y se coloca en el interior de una caja de acrílico transparente durante 5 minutos, se filmó y posteriormente se midió la distancia recorrida.

14.1.4 Fundamento de la viabilidad celular

La membrana de las células vivas excluyen a la mayoría de las moléculas hidrofóbicas. Sin embargo, las células que poseen lesiones en dicha membrana, permiten la entrada al citoplasma de moléculas hidrofóbicas, como el colorante azul de tripano. Por lo tanto, este ensayo se basa en la exclusión de dicho colorante: si las células se encuentran vivas no permiten el ingreso del mismo, mientras que células moribundas o muertas son permeables al colorante (Cetra, 2011).

14.1.5 Cuantificación celular

Para realizar el conteo celular se utilizó un hemocitómetro (Cámara Neubauer), que contiene dos cámaras grabadas y graduadas con diferentes tamaños de cuadrículas para el conteo (Cetra, 2011).

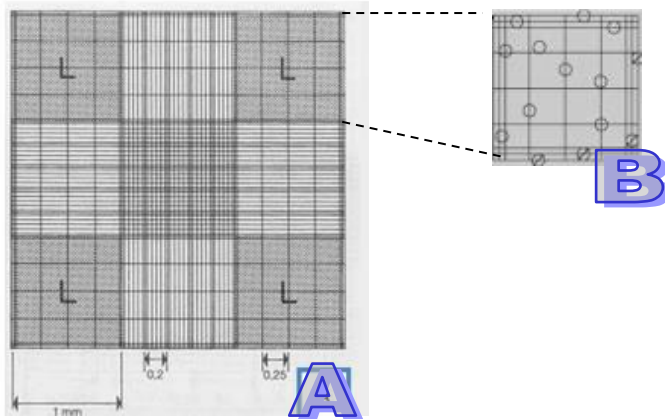


Fig. 23. Hemocitómetro.

Se cuantificaron las células que se encontraron en los cuadrantes marcados con una L (A). Solo se contaron las células que se encuentran dentro del recuadro grande (B).

14.1.6 Microscopía de luz

Procesamiento

Lavado. Los órganos fijados en paraformaldehído 4 % fueron lavados en etanol al 70 %.

Deshidratación. Dos pasos de etanol de 80%, 96% y 100%; de 40 minutos cada uno.

Aclaramiento. Se aclararon con una mezcla 1:1 de etanol 100%-xileno y dos pasos de xileno puro. Cada paso de 40 minutos cada uno.

Inclusión. Se realizaron tres pasos en Paraplast con DMSO y de punto de fusión de 56°C. El primer y segundo paso de 1 hora y el tercer paso de 2 horas.

Corte. De cada órgano se obtuvieron cortes seriados de 7 micrómetros (en plano coronal).

Técnicas de Tinción

Hematoxilina y Eosina y Kluver-Barrera

14.1.7 Tren de tinción Hematoxilina y Eosina

1. Desparafinado: Neoclear I (5 minutos), Neoclear II (5 minutos)
2. Hidratación: Etanol anhidro I (5 minutos), etanol anhidro II (5 minutos), etanol 96° GL I (3 minutos), etanol 96° GL II (3 minutos), etanol 80 ° GL (3 minutos), etanol 60 ° GL (3 minutos) y agua destilada (3 minutos).
3. Tinción: Hematoxilina de Harris 5-8 minutos
4. Lavado: Agua corriente 20 segundos
5. Diferenciación: Etanol ácido 20 segundos
6. Agua de la llave 2 segundos
7. Azuleamiento: Substituto de Scott 1 minuto
8. Agua de la llave 20 segundos
9. Contrastado: Eosina Amarillenta 2-3 minutos
10. Agua destilada 40 segundos

11. Deshidratación: Etanol 96° GL I (30 segundos), etanol 96° GL II (30 segundos), etanol anhidro I (30 segundos), etanol anhidro II (30 segundos), etanol anhidro-xileno (1:1) (30 segundos), xileno I (20 segundos), xileno II (20 segundos).

12. Montaje en Entellan (Merck).

Resultados

Regiones ácidas Azul a morado

Regiones básicas Rosa a naranja

Preparación de colorantes y soluciones

Solución madre de Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina en polvo 1 g

Óxido rojo de mercurio 0.5 g

Sulfato de aluminio y potasio 100 g

Etanol absoluto 10 ml

Agua destilada 200 ml

Disolver la hematoxilina en el etanol absoluto, calentar a baño maría, conservando el vaso tapado; en el vaso de precipitados de 600 ml disolver el sulfato de aluminio y potasio en 100 ml de agua destilada, calentando ligeramente. Se mezclan las dos soluciones y se añaden los 100 ml del agua destilada restante. Se hierve la mezcla un momento, se retira del calor y se deja enfriar. Añadir el rojo de mercurio lentamente (es explosivo) y calentar nuevamente hasta que tome un color rojo púrpura (3 minutos aproximadamente). Enseguida, enfriar con hielo y filtrar 10 veces para eliminar residuos del sulfato. Esta solución es estable, siempre que no se le agregue ácido acético, por lo que se considera solución madre. Conservar en frasco ambar.

Solución de Trabajo de Hematoxilina de Harris.

Solución madre de Hematoxilina de Harris 10 ml y añadir 1 a 3 ml ácido acético, se filtra y se usa.

Solución madre de Eosina Amarillenta.

Eosina Y hidrosoluble 1 g

Agua destilada 20 ml

Etanol de 96° G.L. 80 ml

Se disuelve la eosina en el agua y se le añade el alcohol. Se deja madurar durante tres semanas a la luz y en un frasco transparente.

Solución de trabajo de Eosina Amarillenta.

Una parte de solución madre de eosina amarillenta.

Tres partes de alcohol etílico de 80° G.L.

Agregar 0.6 ml de ácido acético por cada 100 ml de solución de trabajo.

Alcohol ácido.

Alcohol etílico de 70° G.L. 100 ml se le agrega 1 ml de ácido clorhídrico

Substituto de Scott

Bicarbonato de Sodio 3.0 g

Sulfato de Magnesio 20.0 g

Agua destilada 1000 ml

Agregar cristales de Timol para evitar contaminaciones por hongos

14.1.8 Tren de tinción Kluver-Barrera

1. Desparafinado:

Neoclear I (3 minutos), Neoclear II (3 minutos)

2. Hidratación: Etanol anhidro I (3 minutos), etanol anhidro II (3 minutos), etanol 96° GL I (3 minutos), etanol 96° GL II (3 minutos), etanol 80 ° GL (3 minutos), etanol 60 ° GL (3 minutos) y agua destilada (3 minutos).

3. Tinción: Azul luxol

4. Lavado: Agua corriente (40 segundos)
5. Diferenciación: En carbonato de litio (30 segundos) y pasarlo a etanol 70 ° GL (3 minutos). Se repitió 3 veces este paso
6. Lavado con agua destilada (40 segundos)
7. Contraste: Violeta de cresilo (90 minutos)
8. Lavado: Agua destilada (40 segundos)
9. Deshidratación: Etanol 96° GL I (30 segundos), etanol 96° GL II (30 segundos), etanol anhidro I (30 segundos), etanol anhidro II (30 segundos), etanol anhidro-xileno (1:1) (30 segundos), xileno I (20 segundos), xileno II (20 segundos).
10. Montaje en Entellan (Merck).

Resultados

Tractos mielínicos en azul

Cuerpos celulares en morado

Preparación de colorantes y soluciones:

■ Carbonato de litio

Se disolvió 0.05 g de carbonato de litio por cada 100 ml de agua destilada

■ Azul luxol

Se colocó 0.1 g del colorante azul luxol resistente MBS por cada 100 ml de etanol, después se añadió 0.5 ml de ácido acético al 10%.

■ Violeta de cresilo

Se disolvió 0.1 g de violeta de cresilo en 100 ml de agua destilada y cada que era utilizado se añadían 15 gotas de ácido acético glacial.

14.2 Anexos de los resultados

14.2.1 Prueba de elevación corporal

05/12/2013 10:52:29 p.m. 1

Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
Response elevacion

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: grupo	4	22115.51	5528.878	32.46	0.000000*	1.000000
B: t_evelacion	2	233.968	116.984	0.69	0.505536	0.162839
AB	8	876.8878	109.611	0.64	0.739272	0.282595
S	98	16689.95	170.3056			
Total (Adjusted)	112	40072.41				
Total	113					

* Term significant at alpha = 0.05

Power Values for F-Tests with Geisser-Greenhouse Adjustments Section

Source	DF	F-Ratio	Regular Power (Alpha=0.05)	Lower Bound Epsilon Power (Alpha=0.05)	Geisser Greenhouse Epsilon Power (Alpha=0.05)	Huynh Feldt Epsilon Power
A: grupo	4	32.46	1.000000			
B: t_evelacion	2	0.69	0.162839			
AB	8	0.64	0.282595			
S	98					

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	113	64.51003	
A: grupo			
1	14	52.67716	3.487792
2	12	52.50653	3.767245
3	45	83.35686	1.945397
4	15	78.11837	3.369527
5	27	55.89125	2.511497
B: t_evelacion			
1	38	62.62626	2.117009
2	38	64.29434	2.117009
3	37	66.6095	2.145427
AB: grupo,t_evelacion			
1,1	5	57.04625	5.836192
1,2	5	48.79466	5.836192
1,3	4	52.19056	6.52506

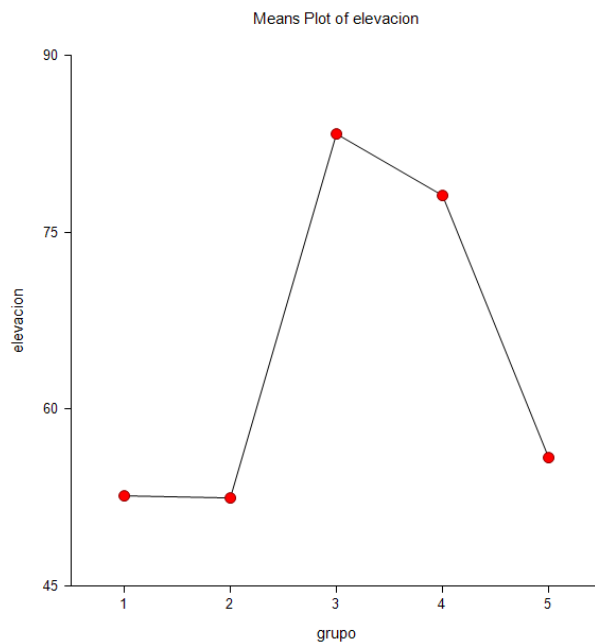
2,1	4	51.25496	6.52506
2,2	4	55.00967	6.52506
2,3	4	51.25496	6.52506
3,1	15	80.25995	3.369527
3,2	15	85.824	3.369527
3,3	15	83.98664	3.369527
4,1	5	70.93939	5.836192
4,2	5	78.33147	5.836192
4,3	5	85.08425	5.836192
5,1	9	53.63075	4.35004
5,2	9	53.51191	4.35004
5,3	9	60.53109	4.35004

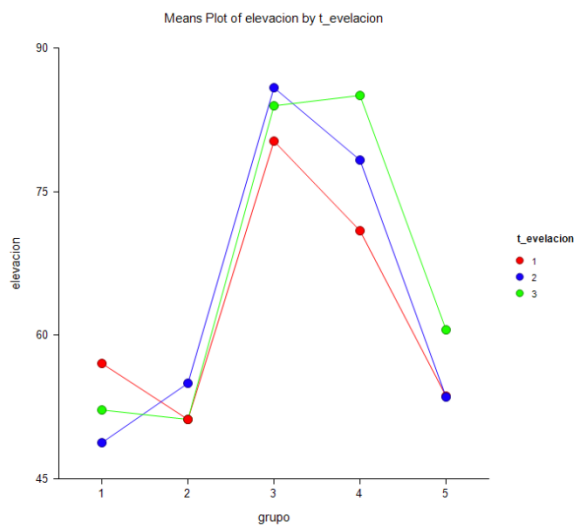
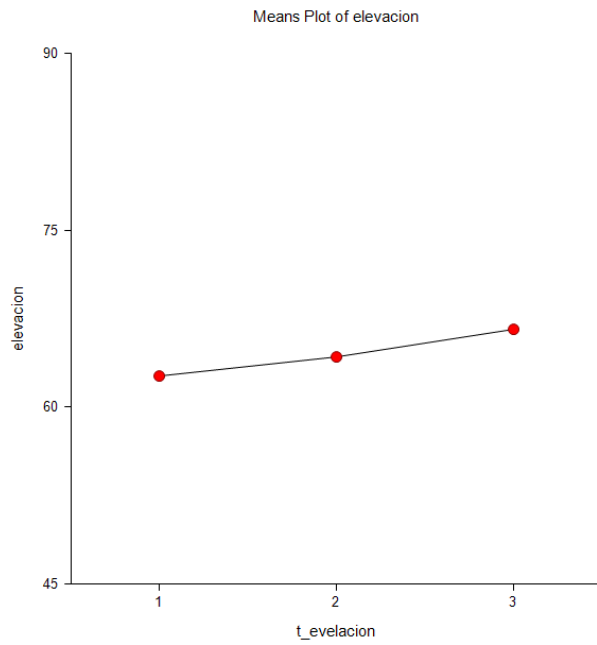
05/12/2013 10:52:29 p.m. 2

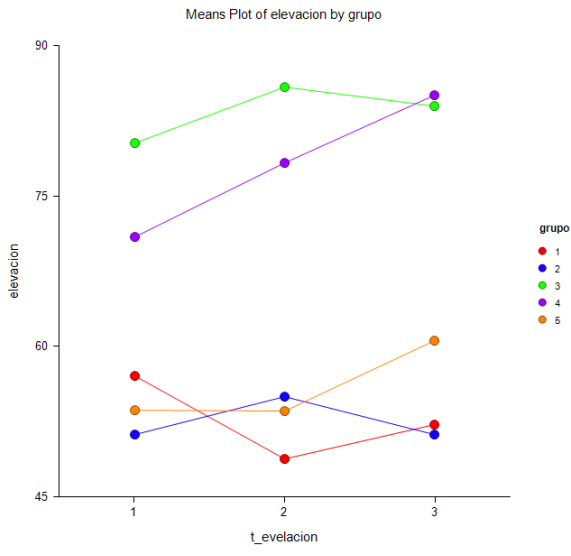
Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
Response elevacion

Plots Section

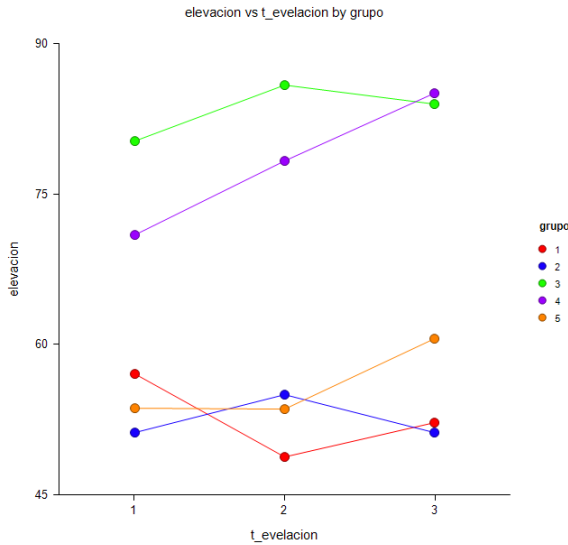






Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
 Response elevacion



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: elevacion
 Term A: grupo

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=98 MSE=170.3056 Critical Value=3.9304

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	14	52.67716	3, 4
2	12	52.50653	3, 4
3	45	83.35686	1, 2, 5
4	15	78.11837	1, 2, 5
5	27	55.89125	3, 4

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
 Response elevacion

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: elevacion
 Term B: t_elevacion

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=98 MSE=170.3056 Critical Value=3.3656

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	38	62.62626	
2	38	64.29434	
3	37	66.6095	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

14.2.2 Prueba de cilindro

05/12/2013 10:54:10 p.m. 1

Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
Response toques_cilin

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: grupo	4	25203.4	6300.85	25.34	0.000000*	1.000000
B: t_cilindro	2	122.9759	61.48797	0.25	0.781370	0.087923
AB	8	2437.105	304.6381	1.23	0.292267	0.538168
S	99	24612.88	248.6149			
Total (Adjusted)	113	52484.88				
Total	114					

* Term significant at alpha = 0.05

Power Values for F-Tests with Geisser-Greenhouse Adjustments Section

Source	DF	F-Ratio	Regular Power (Alpha=0.05)	Lower Bound Epsilon Power (Alpha=0.05)	Geisser Greenhouse Epsilon Power (Alpha=0.05)	Huynh Feldt Epsilon Power
A: grupo	4	25.34	1.000000			
B: t_cilindro	2	0.25	0.087923			
AB	8	1.23	0.538168			
S	99					

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	114	62.79743	
A: grupo			
1	15	50.24937	4.071158
2	12	44.11909	4.551693
3	45	83.55199	2.350484
4	15	76.16727	4.071158
5	27	59.89943	3.034462
B: t_cilindro			
1	38	63.90633	2.557831
2	38	63.2983	2.557831
3	38	61.18767	2.557831
AB: grupo,t_cilindro			
1,1	5	53.09091	7.051453
1,2	5	46.81561	7.051453
1,3	5	50.84158	7.051453
2,1	4	43.21527	7.883763

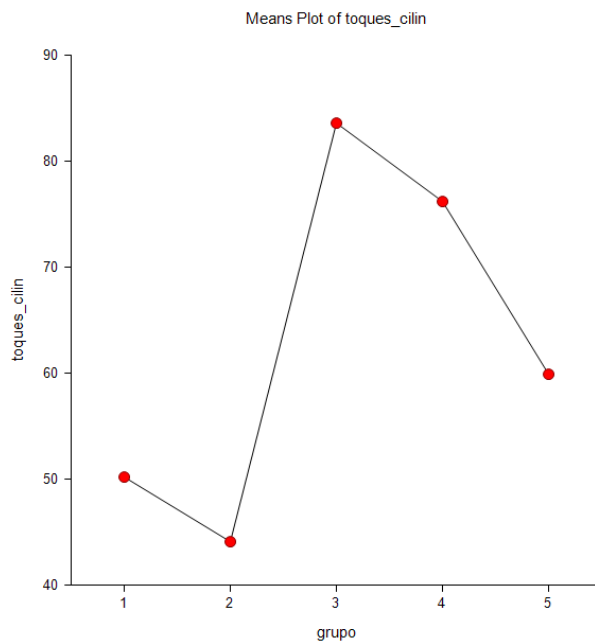
2,2	4	43.78157	7.883763
2,3	4	45.36042	7.883763
3,1	15	80.33878	4.071158
3,2	15	86.55632	4.071158
3,3	15	83.76088	4.071158
4,1	5	71.50183	7.051453
4,2	5	81.66666	7.051453
4,3	5	75.33334	7.051453
5,1	9	71.38486	5.255842
5,2	9	57.67131	5.255842
5,3	9	50.64211	5.255842

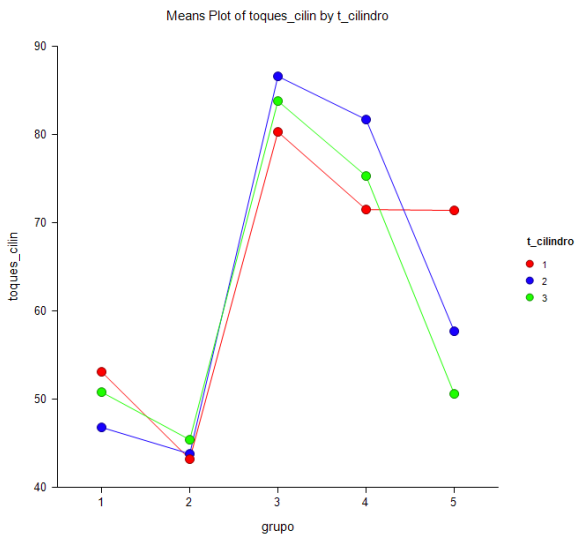
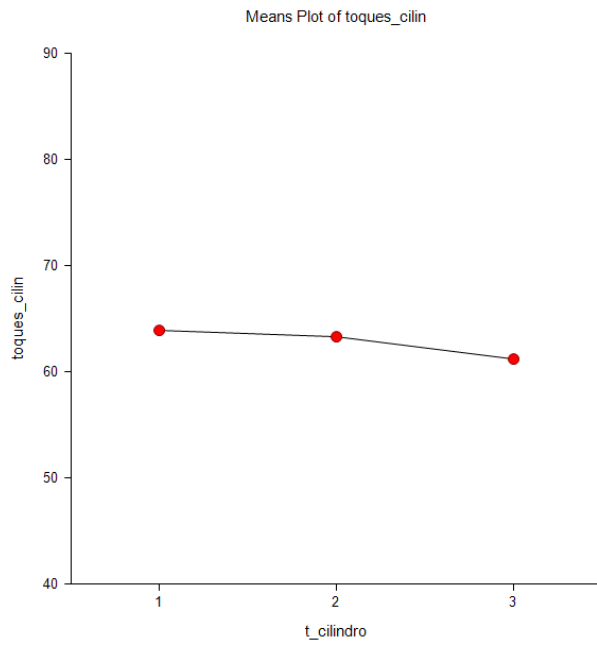
05/12/2013 10:54:10 p.m. 2

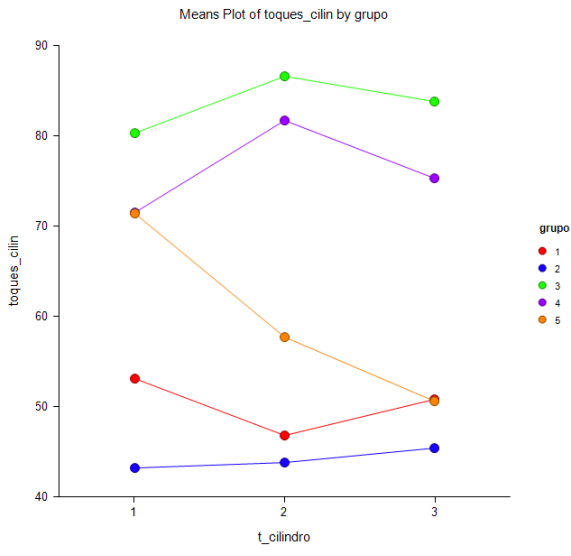
Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
Response toques_cilin

Plots Section

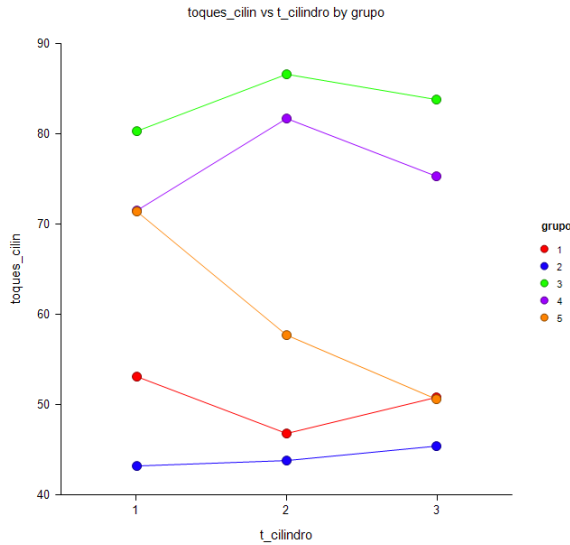






Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
 Response toques_cilin

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: toques_cilin
 Term A: grupo

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=99 MSE=248.6149 Critical Value=3.9297

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	15	50.24937	3, 4
2	12	44.11909	3, 4, 5
3	45	83.55199	1, 2, 5
4	15	76.16727	1, 2, 5
5	27	59.89943	2, 3, 4

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
 Response toques_cilin

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: toques_cilin
 Term B: t_cilindro

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=99 MSE=248.6149 Critical Value=3.3651

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	38	63.90633	
2	38	63.2983	
3	38	61.18767	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

14.2.3 Prueba de campo abierto

05/12/2013 11:00:46 p.m. 1

Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
Response distanc_recorrida

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: grupo	4	1490341	372585.2	14.54	0.000000*	0.999998
B: t_campo_abiert	1	548.9283	548.9283	0.02	0.884088	0.052387
AB	4	279745.9	69936.48	2.73	0.036395*	0.723929
S	66	1691424	25627.63			
Total (Adjusted)	75	3464596				
Total	76					

* Term significant at alpha = 0.05

Power Values for F-Tests with Geisser-Greenhouse Adjustments Section

Source Term	DF (Alpha=0.05)	F-Ratio	Regular Power (Alpha=0.05)	Lower Bound Epsilon Power (Alpha=0.05)	Geisser Greenhouse Epsilon Power (Alpha=0.05)	Huynh Feldt Epsilon Power
A: grupo	4	14.54	0.999998			
B: t_campo_abiert	1	0.02	0.052387			
AB	4	2.73	0.723929			
S	66					

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	76	902.5254	
A: grupo			
1	10	1001.5	50.62374
2	8	961.875	56.59907
3	30	731.3333	29.22763
4	10	769.6	50.62374
5	18	1048.319	37.73271
B: t_campo_abiert			
1	38	899.5108	25.96943
2	38	905.54	25.96943
AB: grupo,t_campo_abiert			
1,1	5	1032	71.59279
1,2	5	971	71.59279
2,1	4	991.25	80.04317
2,2	4	932.5	80.04317

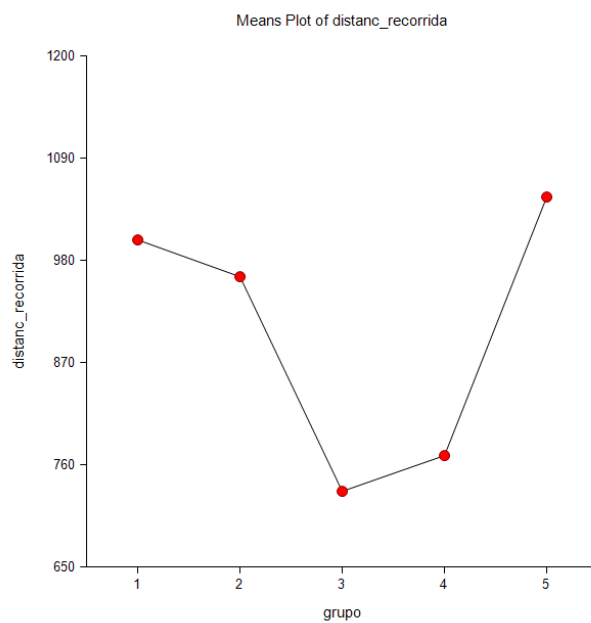
3,1	15	763.3333	41.33411
3,2	15	699.3333	41.33411
4,1	5	777	71.59279
4,2	5	762.2	71.59279
5,1	9	933.9706	53.36211
5,2	9	1162.667	53.36211

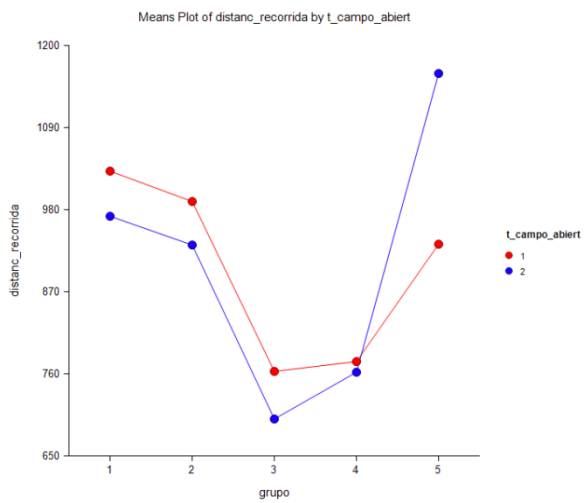
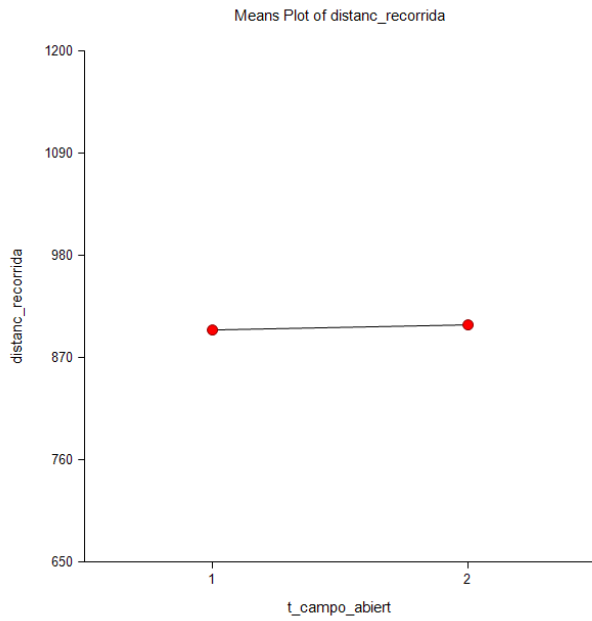
05/12/2013 11:00:46 p.m. 2

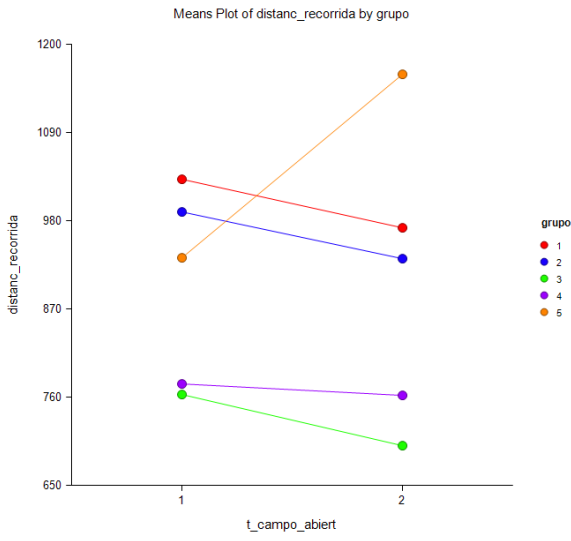
Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
Response distanc_recorrida

Plots Section

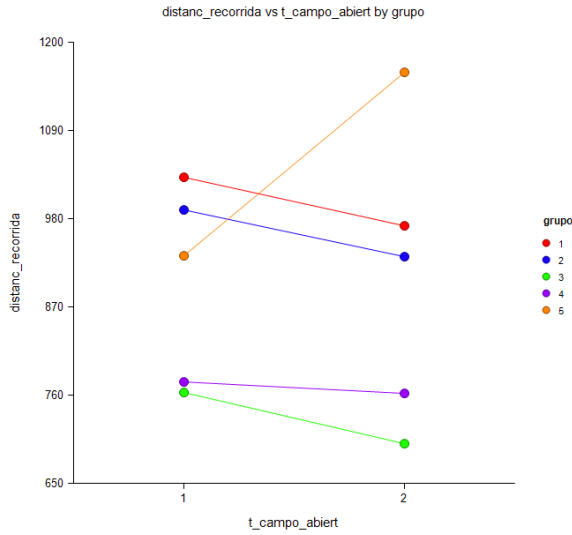






Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
 Response distanc_recorrida



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: distanc_recorrida
 Term A: grupo

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=66 MSE=25627.63 Critical Value=3.9663

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	10	1001.5	3, 4
2	8	961.875	3
3	30	731.3333	1, 2, 5
4	10	769.6	1, 5
5	18	1048.319	3, 4

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Repeated Measures ANOVA Report

Dataset C:\Nohra\Deisy\BD conducta.NCSS
 Response distanc_recorrida

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: distanc_recorrida
 Term B: t_campo_abiert

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=66 MSE=25627.63 Critical Value=2.8236

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	38	899.5108	
2	38	905.54	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

14.2.4 Cuantificación de neuronas en la sustancia nigra

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 06/10/2013 12:25:52 a. m.

Database

Response C3

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: C4	4	232.4041	58.10104	5.36	0.002235*	0.946550
S(A)	30	325.3784	10.84595			
Total (Adjusted)	34	557.7825				
Total	35					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C4

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=30 MSE=10.84595 Critical Value=4.1021

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	9	8.037037	1
4	5	8.333333	
3	5	9.4	1
2	4	13.16667	
1	5	13.97222	5, 3

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 4 06/10/2013 12:25:52 a. m.

Database

Response C3

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

C3	1	2	3	4	5
1	0.0000	0.8278	2.6770	1.7571	3.6355
2	0.8278	0.0000	0.6635	0.7098	1.2419
3	2.6770	0.6635	0.0000	0.2528	0.9943
4	1.7571	0.7098	0.2528	0.0000	0.3340
5	3.6355	1.2419	0.9943	0.3340	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.8070

14.2.5 Cuantificación de células en la sustancia nigra

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 24/11/2013 01:54:21 p. m.
 Database C:\USERS\DEISY HDEZ Z\DOCUME ... ON DE TRASPLANTE EN LA SN.S0
 Response C4

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	-0.2394	0.810807	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	-0.8692	0.384747	Accept
Omnibus Normality of Residuals	0.8128	0.666049	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	1.9276	0.129052	Accept

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: C5	4	15630.85	3907.713	13.49	0.000001*	0.999975
S(A)	33	9555.914	289.5732			
Total (Adjusted)	37	25186.77				
Total	38					

* Term significant at alpha = 0.05

Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
1	5	56.00	11.20	-1.7921	94.5
2	4	83.00	20.75	0.2378	114.5675
3	5	226.00	15.07	-1.9860	103.3532
4	5	77.00	15.40	-0.8853	102.784
5	9	299.00	33.22	4.2404	152

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 24/11/2013 01:54:21 p. m.
 Database C:\USERS\DEISY HDEZ Z\DOCUME ... ON DE TRASPLANTE EN LA SN.S0
 Response C4

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	28	114.391		113.1846
A: C5				
1	5	96.6	7.610167	-16.58464
2	4	112.4988	8.508425	-0.6857947
3	5	102.9212	4.393732	-10.26346
4	5	103.7713	7.610167	-9.413337
5	9	150.1319	5.672283	36.94723

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C4

Term A: C5

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=33 MSE=289.5732 Critical Value=4.0790

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	5	96.6	5
3	5	102.9212	5
4	5	103.7713	5
2	4	112.4988	5
5	9	150.1319	1, 3, 4, 2

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

C4	1	2	3	4	5
1	0.0000	1.2810	0.6738	0.5976	3.5528
2	1.2810	0.0000	0.9088	0.7177	1.8676
3	0.6738	0.9088	0.0000	0.0581	3.8747
4	0.5976	0.7177	0.0581	0.0000	2.8752
5	3.5528	1.8676	3.8747	2.8752	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.8070

14.2.6 Cuantificación de células en el tálamo

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 17/11/2013 10:31:18 p. m.

Database

Response C4

Tests of Assumptions Section

Test	Prob Value	Decision Level	(0.05)
Skewness Normality of Residuals	3.7855	0.000153	Reject
Kurtosis Normality of Residuals	3.0873	0.002020	Reject
Omnibus Normality of Residuals	23.8613	0.000007	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	2.6815	0.043430	Reject

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: C5	4	293762.3	73440.56	33.49	0.000000*	1.000000
S(A)	45	98682.96	2192.955			
Total (Adjusted)	49	392445.2				
Total	50					

* Term significant at alpha = 0.05

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 17/11/2013 10:31:18 p. m.

Database

Response C4

Means and Effects Section

Term	Count	Standard Mean	Error	Effect
All	28	154.34		133.7098
A: C5				
1 5	95.66666	11.0377	-38.04314	
2 4	98.4	20.94256	-35.3098	
3 5	114.4	20.94256	-19.3098	
4 5	99.2	20.94256	-34.5098	
5 9	260.8824	11.3577	127.1725	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C4
Term A: C5

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=45 MSE=2192.955 Critical Value=4.0184

Group	Count	Different From Mean	Groups
1 5	95.66666	5	
2 4	98.4	5	
4 5	99.2	5	
3 5	114.4	5	
5 9	260.8824	1, 2, 4, 3	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

C4	1	2	3	4	5
1 0.0000	0.0302	1.2924	0.2202	5.4214	
2 0.0302	0.0000	1.0089	0.1519	3.5740	
3 1.2924	1.0089	0.0000	0.8571	2.3197	
4 0.2202	0.1519	0.8571	0.0000	3.3852	
5 5.4214	3.5740	2.3197	3.3852	0.0000	

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.8070

14.2.7 Cuantificación de células en el cuerpo estriado

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 1 17/11/2013 10:26:22 p. m.

Database

Response C1

Tests of Assumptions Section

Test Assumption	Prob Value	Decision Level	(0.05)
Skewness Normality of Residuals	1.5619	0.118320	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	1.3510	0.176698	Accept
Omnibus Normality of Residuals	4.2646	0.118564	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	9.8775	0.000009	Reject

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: C2	4	204155.2	51038.8	8.92	0.000024*	0.998283
S(A)	43	245936.8	5719.46			
Total (Adjusted)	47	450092				
Total	48					

* Term significant at alpha = 0.05

Analysis of Variance Report

Page/Date/Time 2 17/11/2013 10:26:22 p. m.

Database

Response C1

Means and Effects Section

Term	Count	Standard Mean	Error	Effect
All	28	163.5		141.0365
A: C2				
1	5	103.2143	20.2122	-37.82225
2	4	102.4	33.82147	-38.63654
3	5	108	33.82147	-33.03654
4	5	149.2	33.82147	8.163459
5	9	242.3684	17.35005	101.3319

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C1
Term A: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=43 MSE=5719.46 Critical Value=4.0261

Group	Count	Different From Mean	Groups
2	4	102.4	5
1	5	103.2143	5
3	5	108	5
4	5	149.2	
5	9	242.3684	2, 1, 3

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

C1	1	2	3	4	5
1	0.0000	0.0960	0.4800	2.6059	4.7300
2	0.0960	0.0000	0.4745	2.2257	3.4141
3	0.4800	0.4745	0.0000	1.7512	2.8170
4	2.6059	2.2257	1.7512	0.0000	0.6135
5	4.7300	3.4141	2.8170	0.6135	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.8070



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 09/12/2013
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna DEISY HERNANDEZ ZUÑIGA, matrícula 2113801346, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha diez de diciembre del 2013 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

TRASPLANTE DE NEURONAS Y CELULAS GLIALES DE LA SUSTANCIA NIGRA DE ANIMALES SANOS A UN MODELO EN RATA WISTAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobado.

JURADO

Presidenta

DRA. ANABEL JIMENEZ ANGUIANO

Secretario

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

Vocal

Dra. Nohra Ely Beltran Vargas

DRA. NOHRA ELSY BELTRAN VARGAS

Vocal

DR. MIGUEL ANGEL HERRERA ENRIQUEZ

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000, Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876