

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



**“Las células troncales neuronales entéricas funcionalmente viables como
alternativa para la reparación de la SNpc en un modelo de rata
lesionada con 6-OHDA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

M. en F.C. María del Carmen Parra Cid

CO-DIRECTORES DE TESIS.

Dr. Abel Santamaría Del Ángel

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Alfonso Carreón Rodríguez

Iztapalapa, Ciudad de México a 9 de Julio del 2020

Declaración de Originalidad

La que suscribe M en F.C. María del Carmen Parra Cid, alumna del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Las células troncales neuronales entéricas funcionalmente viables como alternativa para la reparación de la SNpc en un modelo de rata lesionada con 6-OHDA",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de Doctora en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 17 de junio del 2020.

Atentamente



M. en F.C. María del Carmen Parra Cid

Revisión de tesis Doctoral

Por María del Carmen Parra Cid

CANTIDAD DE PALABRAS 16456

HORA DE ENTREGA

16-JUN.-2020 08:08P. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO

60212307

Revisión de tesis Doctoral

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	issuu.com Internet	359 palabras — 3%
2	www.scribd.com Internet	314 palabras — 2%
3	hdl.handle.net Internet	182 palabras — 1%
4	digital.bl.fcen.uba.ar Internet	167 palabras — 1%
5	eprints.ucm.es Internet	104 palabras — 1%
6	docplayer.es Internet	71 palabras — 1%
7	www.medigraphic.com Internet	67 palabras — < 1%
8	dspace.usc.es Internet	52 palabras — < 1%
9	es.scribd.com Internet	47 palabras — < 1%
10	www.elsevier.es Internet	47 palabras — < 1%
11	aprenderly.com Internet	47 palabras — < 1%

12	doczz.net Internet	38 palabras — < 1%
13	www.redalyc.org Internet	37 palabras — < 1%
14	repositorio.uam.es Internet	37 palabras — < 1%
15	www.uninet.edu Internet	31 palabras — < 1%
16	ddd.uab.cat Internet	28 palabras — < 1%
17	ri.uaemex.mx Internet	28 palabras — < 1%
18	rehabumfrsxxi.wordpress.com Internet	28 palabras — < 1%
19	zaloamati.azc.uam.mx Internet	28 palabras — < 1%
20	helvia.uco.es Internet	26 palabras — < 1%
21	www.medicosecuador.com Internet	26 palabras — < 1%
22	Hugo Sánchez-Castillo, Gabriela L. Franco Olivares, Ana K. Ramírez Reyes, Diana B. Paz Trejo, Florencio Miranda Herrera. "Evaluación de la Nicotina como Estímulo Aversivo", Acta de Investigación Psicológica, 2013 Crossref	25 palabras — < 1%
23	www.cinvestav.mx Internet	22 palabras — < 1%
24	Dalmiro Cazorla Perfetti, María Acosta Quintero, Pedro Morales Moreno. "Evaluación de la	21 palabras — < 1%

Patogenicidad Inhalatoria del Micoinsecticida *Beauveria bassiana* LF14 en Ratones", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2015

Crossref

-
- 25** tesisenxarxa.net 21 palabras — < 1%
Internet
-
- 26** rcientificas.uninorte.edu.co 20 palabras — < 1%
Internet
-
- 27** Guillermo Vilaríño Feltrer. "Conductos de ácido hialurónico para el crecimiento axonal guiado", Universitat Politècnica de Valencia, 2015
Crossref Posted Content
-
- 28** www.sibudec.cl 19 palabras — < 1%
Internet
-
- 29** smb.org.mx 19 palabras — < 1%
Internet
-
- 30** inprf.gob.mx 17 palabras — < 1%
Internet
-
- 31** loquierogritar.blogspot.com 17 palabras — < 1%
Internet
-
- 32** Carmen Parra-Cid, Julieta García-López, Esperanza García, Clemente Ibarra. "An enteric nervous system progenitor cell implant promotes a behavioral and neurochemical improvement in rats with a 6-OHDA-induced lesion", *Neurotoxicology and Teratology*, 2014
Crossref
-
- 33** M^a Dolores Llobat Bordes. "Estudio de los factores materno-embionario que determinan la fertilidad y prolificidad en una línea de conejo seleccionada por velocidad de crecimiento", Universitat Politècnica de Valencia, 2012
Crossref Posted Content

34	revistatrashumante.com Internet	16 palabras — < 1%
35	www.scielo.org.ar Internet	14 palabras — < 1%
36	docs.com Internet	13 palabras — < 1%
37	scielosp.org Internet	12 palabras — < 1%
38	Takashi Namba. "The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus", <i>European Journal of Neuroscience</i> , 10/2005 Crossref	11 palabras — < 1%
39	diposit.ub.edu Internet	10 palabras — < 1%
40	Chalazonitis, Alcmène, Michael D. Gershon, and Lloyd A. Greene. "Cell death and the developing enteric nervous system", <i>Neurochemistry International</i> , 2012. Crossref	10 palabras — < 1%
41	www.researchgate.net Internet	9 palabras — < 1%
42	María Desamparados Andrés Bello. "Aplicación de nuevas tecnologías para el diseño y desarrollo de productos de dorada (<i>Sparus aurata</i>) procedente de acuicultura", <i>Universitat Politècnica de Valencia</i> , 2012 Crossref Posted Content	9 palabras — < 1%
43	orca.cf.ac.uk Internet	9 palabras — < 1%
44	d-nb.info Internet	9 palabras — < 1%

45	ankursinha.in Internet	9 palabras — < 1%
46	www.banrepcultural.org Internet	8 palabras — < 1%
47	idus.us.es Internet	8 palabras — < 1%
48	Carlos Andrés Chiriboga, Marta Raquel Fontanilla. "Cultivos primarios de células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano: un modelo biológico para el estudio de los mecanismos de infección por enterococos.", Biomédica, 2004 <small>Crossref</small>	8 palabras — < 1%
49	Dustin R. Wakeman, Martin R. Hofmann, D. Eugene Redmond, Yang D. Teng, Evan Y. Snyder. "Long-Term Multilayer Adherent Network (MAN) Expansion, Maintenance, and Characterization, Chemical and Genetic Manipulation, and Transplantation of Human Fetal Forebrain Neural Stem Cells", Current Protocols in Stem Cell Biology, 2009 <small>Crossref</small>	8 palabras — < 1%
50	www.archivosdemedicina.com Internet	8 palabras — < 1%
51	Henning Ulrich, Priscilla Davidson Negraes. "Working with Stem Cells", Springer Science and Business Media LLC, 2016 <small>Crossref</small>	8 palabras — < 1%
52	cvoed.imss.gob.mx Internet	8 palabras — < 1%
53	www.jove.com Internet	8 palabras — < 1%
54	dspace.cuni.cz Internet	8 palabras — < 1%

55	Current Topics in Neurotoxicity, 2015. <small>Crossref</small>	8 palabras — < 1%
56	buleria.unileon.es <small>Internet</small>	8 palabras — < 1%
57	eprints.uanl.mx <small>Internet</small>	8 palabras — < 1%
58	dehesa.unex.es <small>Internet</small>	8 palabras — < 1%
59	archivosdeneurociencias.com <small>Internet</small>	8 palabras — < 1%
60	D. Hernandez-Baltazar, L.M. Zavala-Flores, A. Villanueva-Olivo. "El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo", Neurología, 2017 <small>Crossref</small>	6 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR
COINCIDENCIAS

< 15 PALABRAS

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA ACTIVADO

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT (registro 001481) en el nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo (clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020).

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Las células troncales neuronales entéricas funcionalmente viables como alternativa para la reparación de la SNpc en un modelo de rata lesionada con 6-OHDA", que presentó:

M. en F.C. María del Carmen Parra Cid

El día 09 de julio del año 2020.

Jurado:



Presidente: Dra. Beatriz Gómez González
Depto. de Biología de la reproducción, UAM-I.



Secretario: Dr. Alfonso Carreón Rodríguez
Centro de Investigación en Salud Poblacional.
Instituto Nacional de Salud Pública.



Vocal: Dr. Armando Luna López
Instituto Nacional de Geriatria.



Vocal: Dra. María del Carmen Rubio Osornio
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Miembros del comité de tutorial

Director Externo: Dr. Abel Santamaría del Ángel

Laboratorio de Aminoácidos Excitadores.
Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez.

Director Interno: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Asesor externo: Dr. Alfonso Carreón Rodríguez

Laboratorio de Genética y Biomarcadores.
Centro de Investigación en Salud Poblacional.
Instituto Nacional de Salud Pública.

Agradecimientos

Al Dr. Abel Santamaría de quien aprendí mucho, mi más sincero agradecimiento por confiar en mí, por su dedicación, apoyo y comprensión y por respetar mis sugerencias e ideas en la realización de este trabajo.

A la Dra. Mina Konigsberg, agradezco su valioso apoyo, orientación y siempre disponibilidad para realizar esta tesis y durante las reuniones con su equipo de trabajo.

Al Dr. Alfonso Carreón Rodríguez, gracias por su apoyo y atención a mis consultas metodológicas.

Agradezco a todo el jurado por sus atinados comentarios que enriquecieron de manera sustancial mi tesis.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron a este trabajo.

A la MVZ. Elena Contreras y a la Tec. Xóchitl Guerrero, por su apoyo y solidaridad para realizar esta tesis.

A la Biol. Julieta García y al Dr. Alberto Ávila mis grandes amigos, gracias por siempre animarme a seguir adelante con apoyo moral y humano en los momentos más difíciles, sin ustedes no lo hubiera logrado!!

Gracias Rafael y Patricio por ser mi motivación más grande.

Gracias a mis padres y hermanos por estar siempre a mi lado apoyándome.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Enfermedad de Parkinson (EP).....	7
2.1.1 Epidemiología de la Enfermedad de Parkinson.....	8
2.1.2 Fisiología de los ganglios basales.....	9
2.1.3 Neurotransmisión dopaminérgica.....	10
2.1.4 Biosíntesis y catabolismo de la dopamina.....	12
2.1.5 El modelo de 6-OHDA en el estudio de la EP.....	13
2.1.6 Farmacoterapia tradicional en la EP.....	16
2.1.7 Terapia de reemplazo celular.....	17
2.2 Células troncales.....	17
2.2.1 SC durante el desarrollo.....	18
2.2.2 Neurogenésis en el cerebro adulto.....	21
2.2.3 Reemplazo celular dopaminérgico.....	23
2.3 El SNE como fuente de obtención.....	26
de células troncales.	
2.3.1 Desarrollo del SNE y su.....	26
Importancia	

3. Justificación	29
4. Pregunta de investigación	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivo General	30
6.1 Objetivos particulares.....	30
7. Material y Métodos	31
7.1 Reactivos.....	31
7.2 Animales de experimentación.....	32
7.3 Diseño Experimental General.....	33
7.4 Cultivo celular, marcaje y caracterización.....	34
7.4.1 Aislamiento y cultivo en suspensión de las ENSCs.....	34
7.4.2 Determinación de la viabilidad celular en las ENSCs.....	36
7.4.3 Determinación de la proliferación celular (BrdU).....	36
de las ENSCs	
7.5 Denervación dopaminérgica con 6-OHDA.....	37
7.6 Pellets y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en.....	38
células cultivadas	
7.7 Marcaje por inmunofluorescencia (IF) en células cultivadas.....	39
7.8 Marcaje de las ENSCs pre-implante.....	40
7.8.1 Implante de las ENSCs marcadas con CFSE.....	41
7.9 Implante de las ENSCs en la SNpc.....	41
7.10 Análisis histológico.....	42
7.10.1 Tinción de Nissl.....	42

7.10.2 Inmunohistoquímica para TH.....	43
7.11 Análisis estadístico.....	44
8. Resultados.....	44
8.1 Corte de Neuroesferas.....	44
8.2 Las ENSCs en cultivo expresan marcadores de..... Troncalidad	45
8.3 Análisis histológico.....	48
8.3.1 El implante de la ENSCs permanece en la SNpc y..... modifica su morfología	52
8.4 La expresión de MAP-2 incrementó en la SNpc de..... ratas implantadas con ENSCs	55
8.5 La expresión de DAT incrementó en la SNpc de ratas..... implantadas con ENSCs	57
8.6 Las ENSCs implantadas incrementan la expresión de..... TH en la SNpc	59
9. Discusión.....	61
10. Conclusión.....	67
11. Perspectivas.....	68
12. Referencias.....	69
13. Anexo.....	80

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que afecta al sistema dopaminérgico (DAérgico). La terapia de reemplazo celular es una alternativa prometedora destinada a reconstruir la citoarquitectura de las regiones cerebrales afectadas en dicha enfermedad y ha sido abordada ampliamente tanto en modelos animales como en ensayos clínicos, como una opción para recuperar la función que se ha perdido en la EP; sin embargo, aún no se han explorado enfoques experimentales con células obtenidas del Sistema Nervioso Entérico (SNE). Por esta razón, en el presente estudio establecimos las condiciones del implante de células de este sistema. Al establecer las condiciones de trasplante adecuadas, encontramos que las células troncales entéricas (ENSCs) expresaron marcadores de troncalidad; y una vez que fueron implantadas en una región dañada, tuvieron la capacidad de mantenerse y diferenciarse hacia un linaje neuronal y DAérgico durante los primeros 10 días post-implante. Nuestros resultados sugieren que las ENSCs tienen potencial para poder mantenerse, proliferar, diferenciarse y restaurar tejido dañado, por lo que puede ser un buen modelo para el estudio de eventos neurodegenerativos a nivel central.

Palabras clave. Enfermedad de Parkinson, 6-OHDA, Sistema Nervioso Entérico, Neuroesferas, Diferenciación, Dopamina.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affects the dopaminergic system. Cell replacement therapy is a promising alternative aimed at reconstructing the cytoarchitecture of the brain regions affected in this disease. DAergic cell replacement therapy has been widely addressed in both animal models and clinical trials, as a strategy to regain lost function in PD; however, experimental approaches with cells obtained from the Enteric Nervous System (ENS) have not yet been explored. By establishing the appropriate conditions, we found that enteric stem cells (ENSCs) expressed stem markers, and that once they were implanted in a damaged region, they had the ability to maintain and differentiate into a neuronal and DAergic lineage during the first 10 days after implantation. Our results suggest that ENSCs have great potential to maintain, proliferate, differentiate and restore damaged tissue, so it can be a good model for studying neurodegenerative events at the central level.

Keywords. Parkinson's disease, 6-OHDA, Enteric Nervous System, Neurospheres, Differentiation, Dopamine.

Abreviaturas

APO	Apomorfina
BrdU	Bromodesoxiuridina
CFSE	Ester de succinimidil-carboxifluoresceína
CMV	Células fetales de mesencéfalo ventral
COMT	Catecol-orto-metil transferasa
DA	Dopamina
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	Ácido 4-dihidroxifenilacético
DPI	Días post-implante
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ENSCs	Células troncales entéricas
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESC	Células pluripotentes embrionarias
EthD-1	Homodimero de etidio-1
FGF-b	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GP	Globo pálido

GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
HVA	Ácido homovalínico
IF	Inmunofluorecencia
iPSC	Células pluripotentes inducibles
L-Dopa	L-3,4-hidroxi-fenil-alanina
MAO-A	Monoamino-oxidasa forma A
MAP-2	Proteína asociada a microtúbulo 2
MPTP	1-metil-4-fenil-6 tetrahidropiridina
NeuN	Proteína nuclear específica de neurona
NSCs	Célula troncal neuronal
NSs	Neuroesfera
NST	Núcleo subtalámico
PAT	Progenitoras de amplificación transitoria
PCs	Células progenitoras
SC	Células troncales
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNpc	Sustancia negra pars compacta
Sox-2	Factor de transcripción
TH	Tirosina hidroxilasa
6-OHDA	6-hidroxidopamina

1. Introducción

En 1817 James Parkinson describió un síndrome caracterizado por alteraciones motoras, como la dificultad para iniciar movimientos y lentitud en los mismos, temblor de las extremidades durante el reposo y rigidez muscular, al cual llamó Enfermedad de Parkinson (EP) (Blum, Torch et al., 2001, Fahn, 2015). Dicho desorden se caracteriza por la pérdida lenta y progresiva de células dopaminérgicas (NDA) en la sustancia negra pars compacta (SNcp) y la reducción de dopamina (DA) estriatal (Hornikiewicz, 1966, Damier et al., 1999). La farmacoterapia para la EP tiene un efecto estrictamente sintomático (Ferreira et al., 2013), y hasta ahora ningún fármaco ha demostrado tener un efecto curativo o neuroprotector en los ensayos clínicos (Meissner et al., 2011). Los pacientes que presentan la EP inicialmente responden al tratamiento con levodopa (LeWitt 2015) y otros tratamientos a base de anticolinérgicos, agonistas dopaminérgicos (Crispo et al., 2016, Tran et al., 2015), inhibidores de la MAO e inhibidores de la COMT (Cacabelos, 2017), mejorando la sintomatología motora. Sin embargo, el tratamiento a largo plazo reduce la eficacia de los fármacos empleados, generando complicaciones motoras (Kaakkola, 2000). Estas limitaciones han llevado al desarrollo de nuevos tratamientos alternativos para restaurar y regular la neurotransmisión dopaminérgica (DAérgica) a través de la terapia de reemplazo de células DAérgicas. Este y otros enfoques no serían factibles sin modelos experimentales que permitan evaluar la condición patológica, sus síntomas y los mecanismos de la enfermedad. Uno de estos modelos animales es producido por la inyección intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a ratas (Ungerstedt 1968;

Cenci et al., 2002; Blesa et al., 2014). Después de que esta neurotoxina se inyecta en el cuerpo estriado de la rata o en la SNpc, la transmisión DAérgica funcional se altera, mostrando características bioquímicas, moleculares y patológicas de la EP (Cheon et al., 2012).

El sistema nervioso tiene una capacidad limitada de auto reparación/regeneración, y dicha capacidad está restringida a ciertas regiones del cerebro adulto; por esta razón, existe un interés creciente en encontrar métodos para reparar el sistema nervioso mediante el uso de medicina regenerativa y técnicas de reemplazo celular (Ma et al., 2010; Politis et al., 2010; Bergmann et al., 2015). Especialmente cuando existe una pérdida sustancial de células, lo que conduce a un impacto clínico grave, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas en las que hay pérdida de células neuronales; por lo tanto, la utilización de células troncales (SC, por sus siglas en inglés, Stem Cells) podría ser una alternativa para este tipo de padecimientos, debido a que pueden reemplazar la población de células neuronales perdidas durante eventos neurodegenerativos, lo que lleva a trastornos como la EP.

Se sabe que las SC tienen la capacidad de autorreplicarse y que, en condiciones apropiadas, o mediante señales específicas del microambiente, pueden diferenciarse en linajes celulares con fenotipos y funciones especializadas, como las células neuronales y la glía (Schafer et al., 2009; Azan et al., 2011; Joseph et al., 2011). Las SC adultas también se encuentran en la mayoría de los tejidos, incluidos los del SNE (SNE) (Hotta et al., 2013), el sistema nervioso central, el apéndice (Hagl et al., 2013) y el páncreas (Seaberg et al., 2004; Smukler et al., 2011), entre otros. Diferentes estudios han sugerido que las SC pueden diferenciarse a células especializadas (Jiang

et al., 2002; Herzog et al., 2003; Avetisyan et al., 2015). Una característica de las SC es cambiar su propio fenotipo en respuesta a cambios en el microambiente donde se desarrollan, y esta propiedad se conoce como plasticidad (Sánchez-Ramos et al., 2000; Zuk et al., 2002). Debido a las muchas propiedades que caracterizan a las SC, su uso para el diseño de nuevos enfoques terapéuticos está llamando la atención. Principalmente las células troncales del SNE (ENSCs, por sus siglas en inglés, Enteric Neural Stem Cells), debido a la capacidad que tienen para desarrollar un fenotipo DAérgico (Parra-Cid et al., 2014). Además, la relevancia de estos enfoques se ve reforzada por su potencial para desarrollar terapias de reemplazo celular autólogas. Sin embargo, antes de que estos enfoques se exploren y se desarrollen a detalle, es importante establecer las condiciones apropiadas para que las ENSCs desarrollen su plasticidad y validen su capacidad restauradora a nivel experimental.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida lenta y progresiva de las NDA de la SNpc, lo que genera una gradual disminución de los niveles de DA en el estriado (revisado por Hornykiewicz, 1966). Desde el punto de vista patológico la EP se caracteriza por la presencia de cúmulos de proteínas degeneradas en el citoplasma celular, llamados cuerpos de Lewy (Hawkes, 2010). Esta área envía sus proyecciones a larga distancia hacia el putamen (cuerpo estriado), presentándose una disminución en los niveles de DA en dicho núcleo (Kordower et al.,

2013; Parish y Arenas, 2007). Estos núcleos del cerebro son la principal vía de regulación de la función motora; por lo tanto, la pérdida de estas células y de los niveles de DA estriatal generan síntomas asociados al déficit motor como las bradicinesias, acinesias, rigidez, trastornos de la marcha, y cambios posturales (Galván, 2008). En relación a su etiología, se ha propuesto que existen mutaciones genéticas que pueden contribuir a un mayor riesgo para la EP (Cheon et al., 2012).

2.1.1 Epidemiología de la Enfermedad de Parkinson

La EP es una neuropatía degenerativa muy común que afecta a alrededor de 10 millones de personas en el mundo, y su prevalencia se incrementa con el envejecimiento de la población (Pringsheim, 2014). Se estima que la EP se presenta entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años de edad a nivel mundial (De Rijk et al., 2000; Weintraub et al., 2008). De acuerdo al conteo de población y vivienda realizado en 2005 por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el 8.1% de la población en México se encuentra en este grupo de edad, lo que implicaría una prevalencia aproximada de 83,000 a 166,600 personas con EP en México (Mayela et al., 2011). La EP es considerada la segunda patología neurodegenerativa en frecuencia a nivel mundial, sólo después de la enfermedad de Alzheimer (Willis AW, 2013; Schapira AH, 2013). En la actualidad, en México no se cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia o incidencia de la enfermedad.

2.1.2 Fisiopatología de los ganglios basales

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales conformados por el neostriado (caudado y putamen), el núcleo subtalámico (STN), la sustancia negra (SNc y SNr), el globo pálido tanto su segmento interno (GPi) como el externo (GPe). La organización de los ganglios basales (GB) es básicamente dual: considera, por una parte, el estriado como el principal núcleo de entrada de los GB, y por otra, al segmento interno del globo pálido (GPi) y a la parte reticular de la sustancia negra (SNpr) como los núcleos de salida, que ejercen una acción inhibitoria GABAérgica sobre los núcleos ventrales del tálamo. Entre estos núcleos se encuentran dos sistemas de proyección denominados vía directa y vía indirecta. La vía directa proyecta monosinápticamente a los núcleos de salida como lo son el GPi y la SNpr, y la vía indirecta, polisináptica, proyecta a la porción externa del globo pálido (GPe), que envía eferencias también GABAérgicas al núcleo subtalámico (NST), que a su vez proyecta a los núcleos de salida por medio de sinapsis glutamatérgicas. En el estriado, la DA modula los efectos glutamatérgicos de la proyección cortical y ejerce un efecto dual: excitatorio, a través de los receptores D1 de la vía directa, e inhibitorio, a través de los receptores D2 de la vía indirecta (Albin y Young 1989; Cepeda et al., 1993). Se piensa que el efecto neto sobre el control del movimiento de estos circuitos se podría contraponer: la estimulación de las células de la vía directa resulta en una inhibición de los núcleos de salida (facilitando el movimiento), y la estimulación de la vía indirecta lleva a la inhibición del GPe, desinhibición del NST y excitación de los núcleos de salida (inhibiendo los movimientos no deseados) (Alexander et al., 1990; DeLong, 1990; Obeso et al., 1997). En la EP,

este modelo considera que la depleción dopaminérgica tiene como consecuencia la reducción de la inhibición de la vía indirecta, que conduce a una sobre inhibición del GPe, una desinhibición del NST y un incremento en la excitación de los núcleos de salida, cuya inhibición por la vía directa se habría visto reducida. El resultado final es un exceso de activación de los núcleos de salida, acompañado de un exceso de inhibición de los sistemas motores, lo cual da lugar a la bradicinesia. Para el estado discinético el cual puede presentarse con el tratamiento de L-Dopa a largo plazo, se propone un exceso de inhibición de las células de la vía indirecta que conllevaría una desinhibición de las proyecciones del GPe al NST, resultando en la sobreinhibición de éste. La reducción de la actividad excitatoria del NST sobre los núcleos eferentes de los GB ocasionaría la hipoactividad de estos, que reduciría sus efectos inhibitorios sobre el tálamo, lo cual a su vez, sobreestimularía las áreas motoras de la corteza.

2.1.3 Neurotransmisión dopaminérgica

Las células cuyos somas se encuentran en la SNpc y proyectan sus axones hacia el estriado dan origen a la vía dopaminérgica nigroestriatal (Figura 1). El área donde se ubican estas células se denomina A9 y, junto con las áreas A8, A10 y A12, forman parte del conjunto de vías dopaminérgicas centrales. Como se describió previamente, la vía nigroestriatal regula la función motora mientras que las vías mesocortical, mesolímbica y tuberoinfundibular modulan funciones cognitivas, emocionales y neuroendócrinas, respectivamente (Lindvall y Bjorland, 1983). El grupo de células A9 presenta características particulares que permiten diferenciarlas del resto de las

células adyacentes (A8 y A10). Son células voluminosas, de aproximadamente 33 micrómetros (μm) de diámetro, con largas dendritas que se extienden por la SNpc y por la parte dorsal de la SNpr.

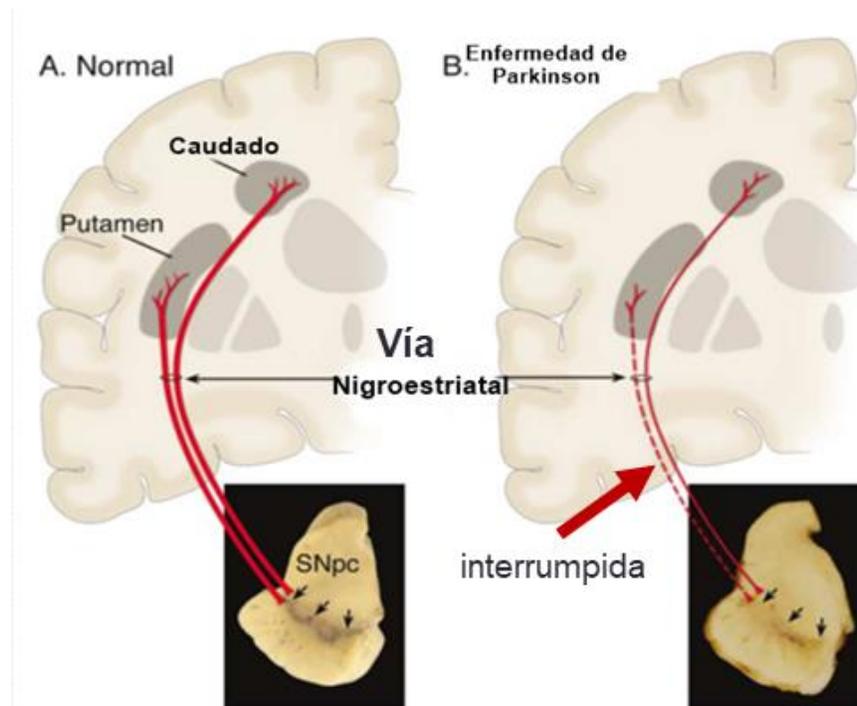


Figura 1. Vía nigroestriatal. En la Enfermedad de Parkinson se ve afectada la vía nigroestriatal, ya que existe muerte de NDA en la SNpc y una disminución de los niveles de DA en el estriado, por lo que la vía nigroestriatal se ve interrumpida, generando alteraciones motoras (modificada de <http://www.ictusyalzheimer.com/parkinson-y-parkinsonismos/enfermedad-de-parkinson>).

2.1.4 Biosíntesis y catabolismo de la dopamina

La DA pertenece al grupo de las catecolaminas y se caracteriza por tener un anillo bencénico con dos hidroxilos; de este se obtendrán las diferentes catecolaminas como la DA, adrenalina y noradrenalina. La biosíntesis de la DA se lleva a cabo en las terminaciones nerviosas DAérgicas, donde se encuentra una alta concentración de la enzima responsable de su síntesis, la Tirosina Hidroxilasa (TH), y de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DOPA descarboxilasa) (Freund et al., 1984). La síntesis de la DA inicia a partir de la L-tirosina, un aminoácido esencial, el cual tiene un anillo bencénico. Por acción de la TH, la L-tirosina se hidroxila formando un hidroxilo (OH) más, que se une al anillo bencénico para formar la L-3,4-hidroxi-fenil-alanina (L-Dopa) y, posteriormente, la L-Dopa es descarboxilada por la enzima DOPA descarboxilasa. Es decir, elimina un grupo carboxilo, dando como resultado a la DA. La degradación de la DA se lleva a cabo cuando ésta es recapturada y convertida por la enzima monoamino-oxidasa A (MAO-A) y la Catecol-orto-metil transferasa (COMT) en el interior de la terminal nerviosa para generar los principales metabolitos de degradación, como el ácido 4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovalínico (HVA), mientras que la DA no capturada por la terminal DAérgica es convertida a HVA por la acción secuencial de la COMT y MAO-A (Qi et al., 2008; Figura 2).

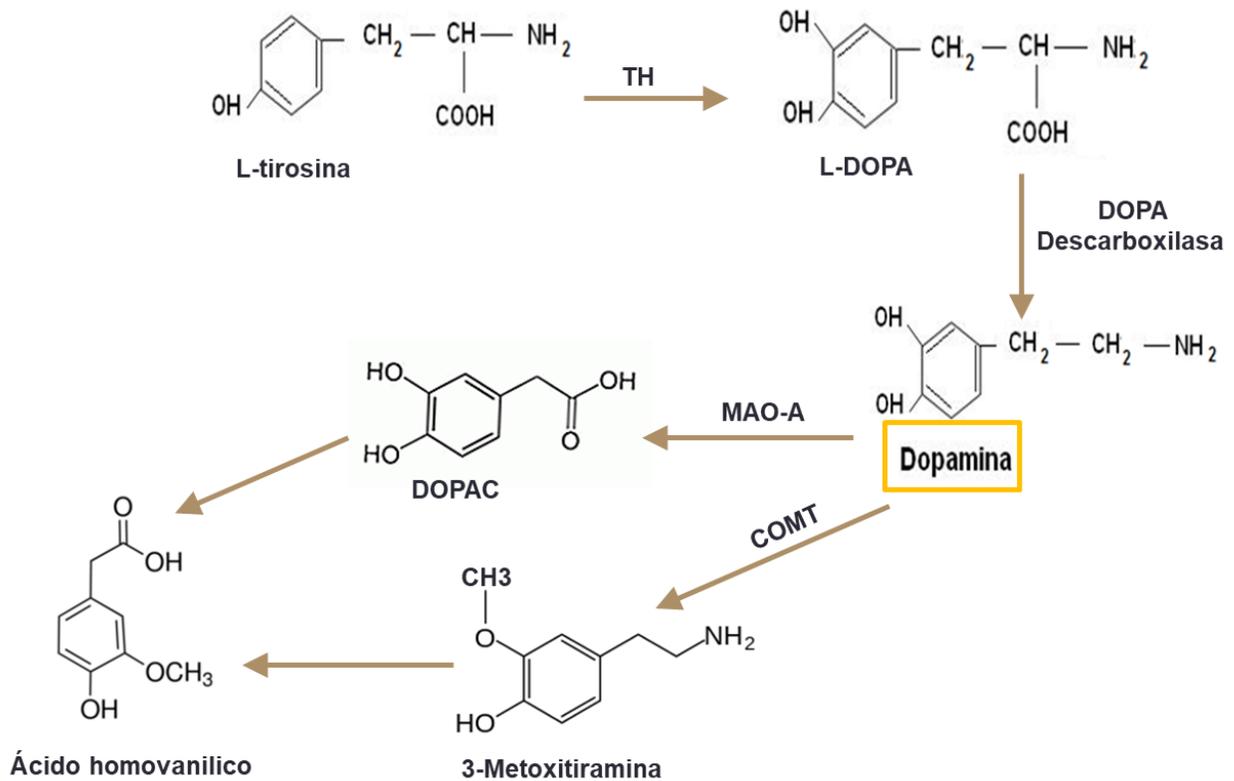


Figura 2. Biosíntesis y catabolismo de la DA. Se muestran las enzimas participantes y metabolitos formados en la vía de biosíntesis y catabolismo de la DA.

2.1.5 El modelo de 6-OHDA en el estudio de la EP

La EP se considera el segundo trastorno neurodegenerativo crónico más frecuente a nivel mundial, y no existe una terapia efectiva para esta enfermedad hasta el momento, por lo que es necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos; sin embargo, para lograr esto, es necesario entender a detalle su etiología, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la neurodegeneración, así como el origen de la disfunción neuronal. Para entender estos aspectos, se han propuesto modelos experimentales que evidencian la patología, los síntomas y los mecanismos patogénicos inherentes a esta enfermedad.

Los modelos más utilizados a nivel experimental hasta ahora son los producidos por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6 tetrahidropiridina (MPTP), dos potentes neurotoxinas, siendo la primera endógena y la segunda exógena. El modelo de 6-OHDA en rata es, por mucho, el más ampliamente utilizado en la investigación de la EP, ya que es un modelo experimental específico en la degeneración de NDA. Una vez que esta neurotoxina es inyectada en el cerebro de los animales, se presentan modificaciones estructurales y funcionales de la transmisión dopaminérgica que son características de la EP (Schober A, 2004). Su efecto tóxico se debe principalmente al estrés oxidativo que genera, la disfunción mitocondrial y procesos de apoptosis de las NDA (Mu et al., 2009). Estos procesos dan como resultado la pérdida de NDA en la SNpc y una consecuente disminución de los niveles de DA en el cuerpo estriado (Dauer y Przedborski, 2003). Este modelo además tiene la característica de reproducir los principales síntomas de la EP, tales como la acinesia, el desequilibrio postural, el temblor y las discinesias (Cenci et al., 2002). El efecto tóxico de la 6-OHDA está dado por el paso de esta neurotoxina de la membrana celular a través de transportadores dopaminérgicos y su posterior acumulación en el citosol de la célula, en donde se oxida fácilmente, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) y citotoxicidad (Blum et al., 2001; ver Figura 3).

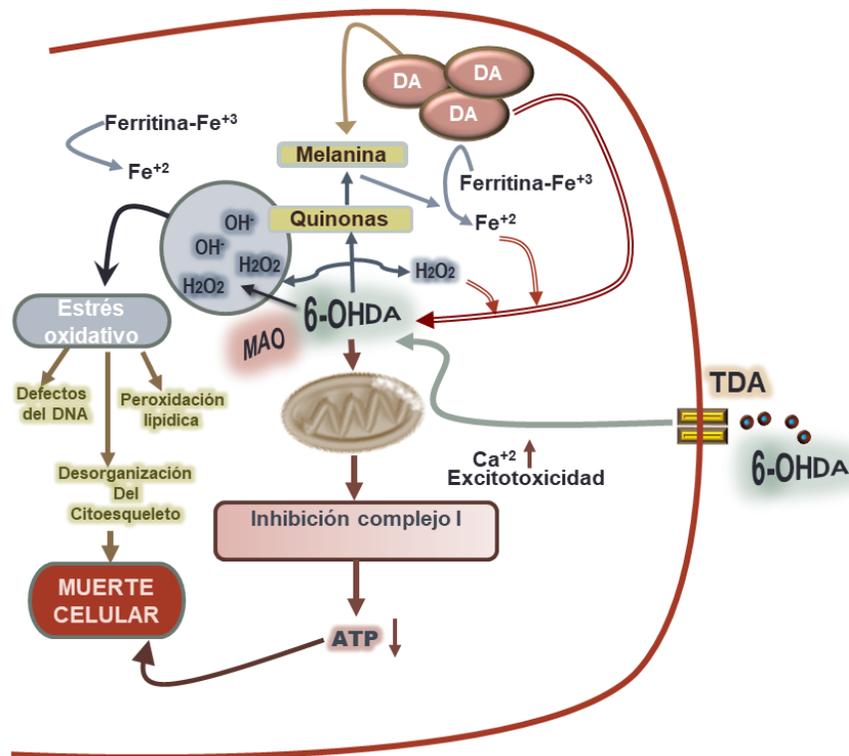


Figura 3. Modelo neurotóxico de 6-OHDA. Mecanismo de acción de la 6-OHDA en la NDA. Transportador de dopamina (TDA); Óxido de hierro (Fe^{+2}); Ion calcio (Ca^{+2}); Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2); Hidroxilo (OH^-); Dopamina (DA); Trifosfato de adenosina (ATP). (Modificado de Blum et al., 2001).

Cuando la 6-OHDA es inyectada en la SNpc, se produce una lesión completa y rápida; la degeneración de NDA se lleva a cabo 12 h antes de una pérdida de las terminales estriatales, y a este tipo de lesión se le conoce como anterógrada. En contraste, cuando la 6-OHDA se inyecta en el estriado, se produce una lesión lenta y progresiva, dañando parcialmente la vía nigroestriatal en un período de hasta tres semanas (Przedborski et al., 1995), por lo que a este tipo de lesión se le conoce como retrógrada. Dicha lesión es muy utilizada debido a que ofrece algunas ventajas: 1) la lesión es lenta y progresiva, 2) el estriado es una estructura de gran tamaño, esto

facilita la inyección mediante cirugía estereotáxica, 3) la degeneración neuronal es secundaria a la lesión de terminales DAérgicas nigroestriatales, 4) representa un modelo de EP en un estadio inicial.

.2.1.6 Farmacoterapia tradicional en la EP

Actualmente la farmacoterapia para la EP está enfocada en restaurar los niveles de DA estriatal. El fármaco de elección ampliamente utilizado es la L-Dopa, el cual es considerado un precursor de la DA, así como la búsqueda de bloqueadores de la recaptura de DA, potenciando su liberación como lo es el caso de la amantadina (LeWitt PA, 2015). Otra parte de la farmacoterapia se enfoca en la búsqueda de fármacos que puedan prevenir, retardar o paliar la aparición de los síntomas motores como consecuencia del desbalance neuroquímico, y cuyo objetivo es el mantenimiento de este, mediante la búsqueda de inhibidores del catabolismo de la DA como lo es la entacapona para la COMT y la selegilina como inhibidor de la MAO (Rodríguez y Ferreira, 2014; Müller y Möhr, 2019). Si bien este tipo de farmacoterapia provee un beneficio en las primeras etapas de la enfermedad, con el tiempo cada uno de estos tratamientos tiene efectos secundarios, disminuyendo su potencia y causando fluctuaciones motoras de “encendido y apagado”, así como la aparición de discinesias, por lo que estos tratamientos no modifican a la EP a largo plazo (Parish y Arenas, 2007). La farmacoterapia con L-DOPA ha sido una alternativa de elección en el tratamiento de la EP desde hace 50 años; sin embargo, sus efectos secundarios a

largo plazo han sugerido la necesidad de nuevas propuestas como tratamientos alternativos para la restauración y regulación de la neurotransmisión DAérgica.

2.1.7 Terapia de reemplazo celular

La terapia de reemplazo celular DAérgico ha sido abordada ampliamente tanto en modelos animales como en ensayos clínicos como un esfuerzo para recuperar la función que se ha perdido en la EP. Las células más empleadas en la terapia de reemplazo son las células troncales (SC).

2.2 Células troncales

Las SC se definen de acuerdo a criterios funcionales, ya que este tipo de células no poseen características morfológicas que puedan distinguirlas del resto de las células del tejido al que pertenecen. Con base en esto, las SC son células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de autoreplicación, que pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo (Mayani, 2003; Figura 4). La autoreplicación es un concepto importante para poder entender la definición de SC, esto debido a que en el momento en que las SC se dividen, por lo menos una de las dos células resultantes conserva la totalidad de las características de la célula original (Figura 4)

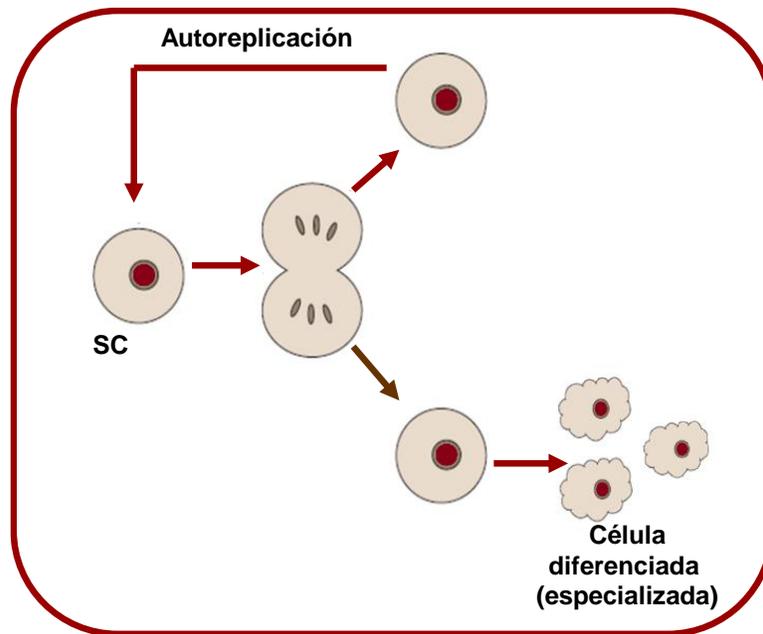


Figura 4. Características de una célula troncal. Son células con capacidad de multiplicarse a través de divisiones simétricas y de autorrenovarse/diferenciarse tras procesos de división asimétrica.

2.2.1 SC durante el desarrollo.

Durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, se generan diversos tipos de SC, la primera SC es el huevo fertilizado o cigoto, ésta se considera como *célula troncal totipotencial*, la cual es capaz de generar tanto al embrión como a las estructuras que no formarán parte de él, pero que son fundamentales para su desarrollo, por ejemplo, la placenta, saco vitelino y el cordón umbilical. Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio llamado blastocisto, en el que cada una de las células que forma parte de la masa interna es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo; a este tipo de células se les conoce como *células*

troncales pluripotenciales o células troncales embrionarias. Estas se caracterizan por la falta de capacidad para formar las estructuras extraembrionarias. A partir de estas células se generan las *células multipotentes*, capaces de dar origen a precursores neurales, también multipotentes, que generarán células o células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) (Homem et al., 2015; Becker, 2017; Navarro et al., 2018). Las *células multipotentes* tienen como característica principal la plasticidad de diferenciación que excede a su tejido de origen. El término de plasticidad se refiere a la capacidad de una SC de un tejido específico para dar origen a células de otros tejidos (Hayashi y Surani 2009). El desarrollo de una célula a lo largo de un linaje puede ser representado como un proceso lineal, con un incremento gradual en la especialización, una pérdida en la diferenciación y en la capacidad proliferativa hasta llegar a un fenotipo terminal (Ulloa y Briscoe, 2007). La regulación final del proceso depende de estímulos que reciben las células, ya sean mediadores solubles, interacciones celulares o matriz extracelular, lo que constituye el nicho de las células troncales neuronales (NSCs por sus siglas en inglés, Neural Stem Cells) (Riquelme et al., 2008). En el caso de las células de linaje neural se ha demostrado la existencia de poblaciones intermedias que se describen en la Figura 5. Las SC son la primera población del linaje; posteriormente se genera una célula precursora que posee el mismo potencial que la SC, pero que no posee la capacidad de autoreplicarse, y esta población se conoce como progenitora de amplificación transitoria (PAT) multipotente. Estas células poseen la mayor parte de los marcadores presentes en las SC, teniendo una tasa de proliferación alta. Posteriormente se generan células progenitoras

(glioblasto y neuroblasto), las cuales están comprometidas para diferenciarse hacia un linaje especializado (Ming y Song, 2011).

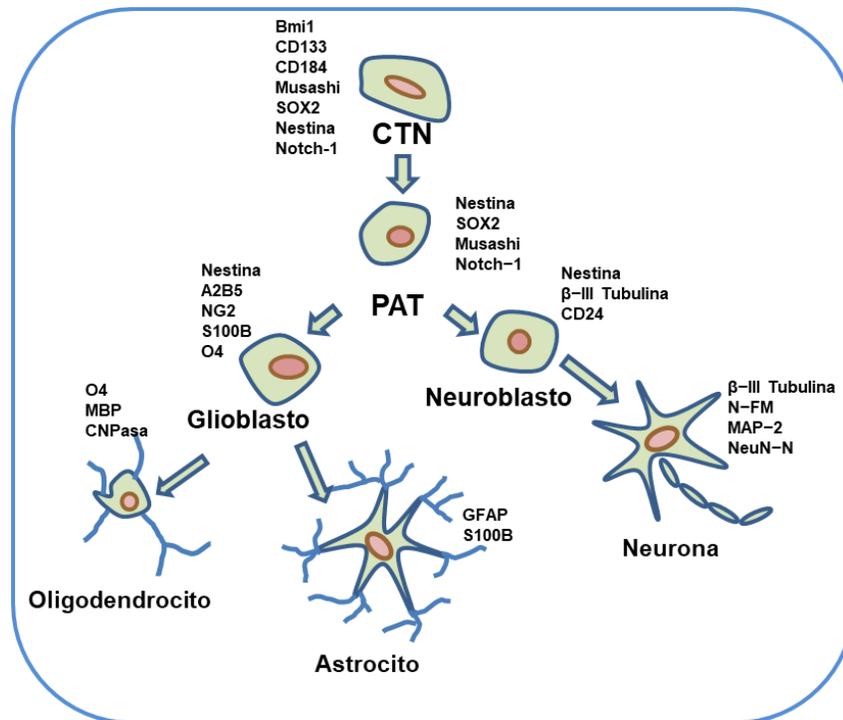


Figura 5. Multipotencialidad de las células troncales neuronales. Las SC son células capaces de generar neuroblastos y glioblastos, los cuales pueden producir células, astrocitos y oligodendrocitos, es decir, todos los tipos celulares de estirpe neural. En la imagen se muestran las proteínas de cada fase de diferenciación.

2.2.2 Neurogénesis en el cerebro adulto

En varias especies, durante la etapa postnatal y a lo largo de toda la vida, se ha demostrado que continúan generándose nuevas células. Las áreas neurogénicas incluyen a la zona subventricular (ZSV) (Habela et al., 2020), el bulbo olfatorio (BO) (Lim y Alvarez-Buylla, 2016) y el hipocampo (Kempermann et al., 2015; Pallotto y Deprez, 2014). Sin embargo, existe evidencia de que el estriado (Dayer et al., 2005) e incluso la SNpc (Zhao et al., 2003) podrían ser zonas neurogénicas. El desarrollo del sistema nervioso central termina en etapas tempranas postnatales y, a partir de ese momento, los circuitos neuronales se fortalecen mediante la plasticidad sináptica; es decir, formándose nuevas conexiones. Existe una progresión de la expresión de marcadores inmaduros a maduros, que está relacionado con los cambios morfológicos en las SC (ver Figura 6). Las SC (células tipo 1) tienen características de glía radial y propiedades astrocíticas, por lo que en esta etapa se puede encontrar la expresión de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (Seri et al., 2001). También se expresa nestina en un 5% de las divisiones celulares, (Alvarez-Buylla et al., 2001; Filippov et al., 2003; Kronenberg et al., 2003). Las células de tipo 1 se dividen asimétricamente; la morfología durante la fase M del ciclo celular sugiere que la célula hija que se genera de la célula tipo 1 también expresa nestina y dicha célula es nombrada célula de tipo 2 (Fukuda et al., 2003). Las células de tipo 2 y 3 son células progenitoras que se amplifican transitoriamente en un linaje neuronal. Las células de tipo 2 son negativas a GFAP y altamente proliferativas (Filippov et al., 2003). En esta etapa se presentan dos subtipos de células que pueden expresar nestina y doble cortina (DCX)

(Kempermann et al., 2018). Las células de tipo 3 son positivas a DCX y son altamente proliferativas; se considera que esta etapa es determinante para la diferenciación neuronal, ya que se forman los neuroblastos, por lo que se presentan importantes cambios morfológicos. Este tipo de células expresan la forma polisilada de la molécula de adhesión neuronal (PSA-NCAM). En la siguiente etapa se encuentran las células recién formadas, las células inmaduras y las células granulares maduras que expresan marcadores post-mitóticos como la calretinina, que posteriormente se intercambia por calbidina (Brandt et al., 2003), al igual que NeuN (Steiner et al., 2004).

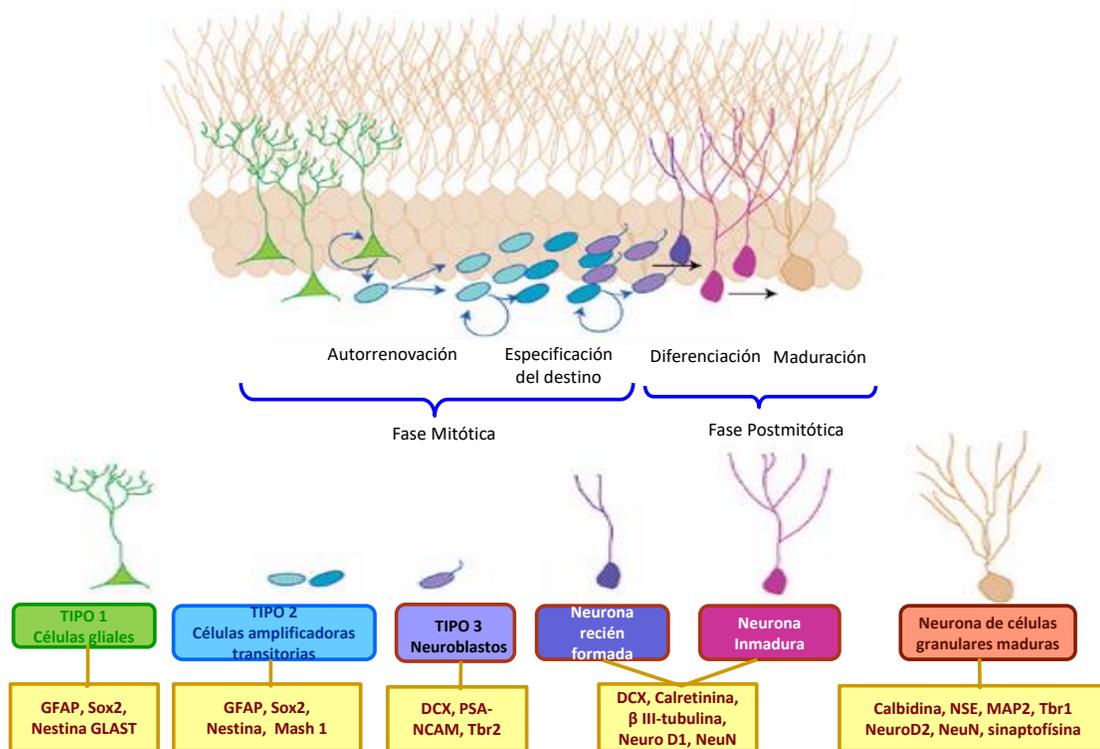


Figura 6. Cascada de diferenciación neuronal. Se muestra las diferentes etapas para la diferenciación neuronal y los marcadores que se expresan en cada una de las etapas (Modificado de Kempermann et al., 2004; Eisch et al., 2008; Cardozo, 2015).

2.2.3 Reemplazo celular dopaminérgico

En general, la terapia de reemplazo celular en la EP consiste en implantar NDA provenientes de diferentes fuentes de células donantes, como son las células troncales neurales fetales, las células troncales pluripotentes (que incluyen a las células embrionarias -ESC- y a las células pluripotentes inducibles -iPSC), las células troncales neurales autólogas y las células troncales neurales mesenquimales (Grealish et al., 2014; Wernig et al., 2008; Wakeman et al., 2017;) En el caso del implante de las células neurales fetales, se ha descrito que existen problemas éticos debido a la fuente de obtención y posibles problemas de histocompatibilidad, siendo esto una limitante importante, además de ser una fuente insostenible, ya que cada paciente con la EP requiere del tejido de hasta siete fetos para tener una respuesta clínica aceptable (Winkler et al., 2005). Debido a esto, la investigación se ha enfocado en proponer a las ESC y las iPSC como fuente de obtención de células, que tiene como ventaja ser una fuente de células ilimitadas. Se ha demostrado que la terapia de reemplazo mediante células fetales de mesencéfalo ventral (CMV) puede llegar a ser beneficiosa para los pacientes con EP (Ma et al., 2010; Pollitis et al., 2010), por lo que estas células troncales embrionarias humanas son consideradas como una fuente de obtención opcional (Kirkeby et al., 2012; Xi et al., 2012); sin embargo, la disponibilidad de tejido fetal es muy restringida. Las NDA del CMV se derivan durante el desarrollo embrionario (Ono et al., 2007), y se sabe que existen diferentes factores de transcripción y factores de crecimiento que son determinantes para la diferenciación de células DAérgicas, como son Sonic hedgehog (Shh), factor de crecimiento fibroblástico 8a (FGF8a) y

Wnt1 (Hynes, 1995; Cooper et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado en ensayos clínicos que el implante de este tipo de células puede causar discinesias debido a la contaminación de células; es decir, a una población de células serotoninérgicas que se implantan con las células DAérgicas (Carlsson et al., 2007; Politis et al., 2010). Por otra parte, la obtención de una cantidad suficiente de células para poder ser implantadas no es fácil, además de que la integración y la supervivencia de estas células es mínima (Hagell et al., 2002). Por lo tanto, es determinante eliminar a las células no deseadas de la población donante. Otro punto a considerar es el momento en el cual esta población de células es implantada; es decir, se tiene que tomar en cuenta la etapa de diferenciación al momento del implante para garantizar la supervivencia de las NDA. En relación con las ESC, se pueden obtener del mesencéfalo humano con técnicas de selección y mediante el cultivo de células precursoras neuronales apropiadas (Cho et al., 2008). Cuando estas células han sido implantadas en modelos animales, la recuperación funcional ha sido de forma parcial, ya que aún no se ha demostrado la liberación de DA *in vivo*. Otra gran desventaja que presenta este tipo de células es que producen tumores (Roy et al., 2006). Otra de las estrategias que se ha propuesto para el trasplante dopaminérgico en pacientes con la EP es el trasplante de iPSC. Estas células se han propuesto como una fuente prometedora, ya que constituyen una fuente autóloga de células dopaminérgicas, por lo que éstas no generan implicaciones éticas ni inmunológicas. Estas células se obtienen de fibroblastos provenientes del mismo paciente (Takahashi et al., 2007) que son manipulados genéticamente, aunque su funcionalidad y su capacidad de formar conexiones sinápticas únicamente se ha demostrado a nivel experimental (Wernig et al., 2008). En la tabla 1 se muestran

ejemplos de las fuentes de obtención de células dopaminérgicas y los resultados más relevantes obtenidos a nivel experimental utilizando los dos principales modelos de lesión DAérgica y las dos regiones de implante más estudiadas.

Tabla. 1. Fuentes de obtención de células dopaminérgicas.

Fuente de obtención	Modelo	Resultado	Referencia
Células troncales neurales MV (hVM1)	Implante intraestriatal en rata lesionada con 6-OHDA	5 meses pos-implante se generan células DAérgicas con fenotipo A9. El implante generó células DAérgicas maduras. Disminuyó la conducta de giro y mejoró el rendimiento cognitivo	Moreno et al., 2012
Células troncales embrionarias humanas (hESC)	Implante intraestriatal en ratas atímicas y Sprague-Dawley lesionadas con 6-OHDA	Las células del implante sobrevivieron a largo plazo y restauraron la neurotransmisión DAérgica <i>in vivo</i> . Fueron capaces de inervar a larga distancia. El crecimiento axonal cumplió los requisitos para uso en humanos.	Grealish et al., 2014
Células Troncales pluripotentes inducidas (iPSC-mDA)	Implante intraestriatal en rata lesionada con 6-OHDA y lesión con MPTP en primates no humanos	El implante sobrevivió, inervó y mantuvo el fenotipo DAérgico. Se encontró una re inervación estriatal tanto en roedores como en monos. 6 meses pos-implante se mostró una recuperación en los déficits motores	Wakeman et al., 2017
Células Troncales Entéricas (ENSCs)	Implante intranigral de ENSCs en rata lesionada con 6-OHDA	Se encontró una recuperación de los niveles de DA. Se reportó una recuperación parcial de movimientos motores finos	Parra et al., 2014

Ejemplos de diferentes fuentes de obtención de células que pueden diferenciarse hacia un linaje DAérgico, y modelos más utilizados y sitios de implante DAérgico.

2.3 El SNE como fuente de obtención de células troncales

2.3.1 Desarrollo del SNE y su importancia

Las neuronas y las células gliales del SNE derivan de la cresta neural; mientras están migrando, las células de la cresta neural son morfológicamente indistinguibles de las células mesenquimales a través de las cuales migran (Young et al., 2000). En embriones de pollo se demostró que la ablación de la cresta neural a nivel vagal (somitas 1-7) dio como resultado la ausencia de células entéricas en todo el intestino, demostrando que la cresta neural a nivel vagal es la única fuente de células que dará origen al SNE (Yntema y Hammond, 1954). Posteriormente, Burns y cols. (2001) demostraron que las células de la cresta neural vagal (Figura 7A) adyacente a las somitas 1-7 (Figura 7B) son la mayor fuente de células troncales entéricas (ENSCs, por sus siglas en inglés, Enteric Neural Stem Cells) y que las células de la cresta neural del nivel sacro (Figura 7A) contribuyen al SNE principalmente en el intestino distal (Le Douarin y Teillet, 1973). Las poblaciones pre migratorias y migrantes de células de la cresta neural contienen mayoritariamente células multipotentes y se encuentran presentes en el intestino adulto (Kruger et al., 2002).

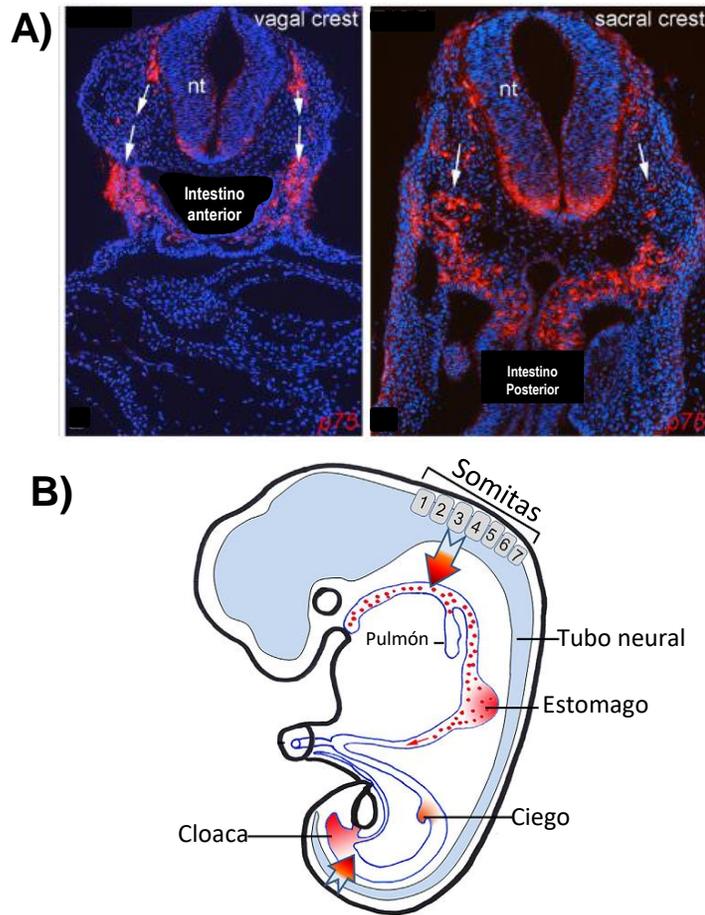


Figura 7. Ruta migratoria y diferenciación de las células troncales entéricas derivadas de cresta neural. Se muestran secciones de un embrión de ratón (E10.5). **A)** Se muestran las ENSCs positivas a p75 (rojo) vagales y del sacro que migran desde el tubo neural hacia el intestino; las flechas en blanco muestran la ruta migratoria para la formación del intestino anterior y posterior. **B)** En el esquema se observa como las células de cresta neural vagal (flecha roja) invaden el intestino anterior y migran en dirección caudal hacia intestino medio y distal. Los puntos rojos representan la migración de las ENSCs. Las células de la cresta neural sacra contribuyen a la formación del colon (Modificado de Nagy y Goldstein, 2017).

Por esta razón, el SNE es considerado una fuente de obtención de células troncales con características multipotentes y con potencial de troncalidad. Es por ello que en la última década diversos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de este modelo, demostrando su capacidad de plasticidad y reparación en tejido dañado. Hagl y cols. (2013) mostraron evidencias de la neurogénesis en el SNE humano adulto obteniendo células progenitoras a partir de apéndice. Implantaron esas células en forma de neuroesferas (NSs por sus siglas en inglés) en cortes de cerebro de rata *in vitro*, lo cual dio como resultado la formación de redes de células gliales, neuronas y fibras de interconexión, demostrando que el SNE tiene potencial como fuente de células troncales neurales autólogas. Posteriormente, Hotta y cols. (2013) demostraron que al implantar NSs generadas a partir de células derivadas de la cresta neural intestinal fetal y postnatal en el colon de ratones postnatales, las células derivadas de las NSs migraron, proliferaron y generaron neuronas y células gliales similares al colon receptor. Las células derivadas del implante mostraron características morfológicas, neuroquímicas y electrofisiológicas similares a las de las células entéricas; con estos resultados demostraron que las células progenitoras neurales entéricas trasplantadas tienen la capacidad de generar células funcionales en el intestino postnatal. Finalmente, en un trabajo previo de nuestro grupo, demostramos que el implante de ENSCs en ratas lesionadas con 6-OHDA en SNpc también puede ser funcional, ya que se encontró una recuperación de los metabolitos DAérgicos y una recuperación parcial de la conducta motora (Parra et al., 2014). Estos hallazgos demuestran que el implante de células troncales neuronales entéricas puede generar células funcionales en diferentes sitios y modelos de lesión. Por lo que la

utilización de estas células podría ser una alternativa como fuente de obtención y terapia de reemplazo celular para enfermedades neurodegenerativas y neuropatías entéricas.

3. Justificación

La farmacoterapia con L-DOPA ha sido una alternativa de elección en el tratamiento de la EP; sin embargo, sus efectos secundarios a largo plazo han sugerido la necesidad de nuevas propuestas como tratamientos alternativos para la restauración y regulación de la neurotransmisión DAérgica. La utilización de las ENSCs para reparar tejido con una pérdida parcial o completa de células es una herramienta prometedora para la restauración del SNE. Existe la necesidad de reparar al sistema nervioso central mediante una terapia que pueda ayudar a la recuperación funcional en las áreas en donde también existe pérdida de células, como ocurre en la EP. Por lo tanto, es necesario establecer las condiciones necesarias a corto plazo para demostrar que las ENSCs son capaces de ser implantadas exitosamente y restaurar *a posteriori* el tejido dañado.

4. Pregunta de investigación

¿El implante de las células progenitoras neuronales entéricas en SNpc será funcionalmente capaz de mantenerse y diferenciarse en linaje neuronal y dopaminérgico en la SNpc dañada?

5. Hipótesis

Dado que se ha demostrado que las ENSCs tienen propiedades de auto-renovación y multipotencialidad, las ENSCs serán funcionalmente viables al ser implantadas en la SNpc y tendrán la capacidad de mantenerse, diferenciarse y reconstituir el tejido dañado por 6-OHDA en la SNpc.

6. Objetivo General

Demostrar que el implante de ENSCs en la SNpc, es funcional y estructuralmente capaz de reconstituir el tejido dañado de la SNpc en un modelo de rata lesionada con 6-OHDA.

6.1 Objetivos particulares

1. Caracterizar a las ENSCs con marcadores de troncalidad
2. Analizar los cambios morfológicos en la SNpc post implante.
3. Examinar si las células implantadas se mantienen y se diferencian a un linaje neuronal y DAérgico
4. Evaluar si el implante de las ENSCs reconstituye el tejido dañado.

7. Material y Métodos

7.1 Reactivos

La 6-OHDA, apomorfina, parafina, violeta de crésilo, hematoxilina de Harris, etanol, glicina, poli-L-lisina, dispasa tipo I, colagenasa tipo XI, DNAsa I, Hoechst, TESP, paraformaldehído y el anticuerpo monoclonal anti-MAP-2 (proteína asociada a microtúbulos 2, M3696) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). El BrdU (bromodesoxiuridina; In Situ Cell Proliferation Kit FLUOS, 11810740001) fue comprado a Roche (Basilea, Switzerland). El CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína, Cell Labeling Kit, ab-113853), FITC (Isotiocianato de fluoresceína), Rojo Texas y el anticuerpo policlonal anti-GFAP (Proteína ácida fibrilar glial, ab-16997), anticuerpo policlonal anti-Sox-2, (ab-97959) y anticuerpo monoclonal anti-Nestina (ab-22035) fueron comprados a Abcam (Cambridge, UK). El anticuerpo anti-TH (Tirosina hidroxilasa) y el anticuerpo monoclonal Anti-DAT (transportador de dopamina, sc-32258.) fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA, sc-14007) y Solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución Hank's y el ácido ascórbico fueron obtenidos de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El Kit LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (L3224) se compró a Invitrogen Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El FluoroCareMountant fue obtenido de Biocare Medical (Pacheco, CA, USA). Todas las soluciones requeridas se prepararon utilizando agua desionizada de un sistema Milli-RQ (Millipore, MA).

7.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 21 ratas macho de la cepa Wistar de 7-8 semanas de edad, con un peso de 290-300 g al comienzo del experimento, las cuales fueron alojadas en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum*. Para los cultivos celulares se utilizaron camadas de ratas Wistar recién nacidas (1 día de edad; $n=60$). Las camadas fueron mantenidas junto a su madre en jaulas de acrílico, con cama de aserrín, agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h y a una temperatura de 21-24°C. El uso y manejo de los animales se realizó bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Todo el protocolo experimental fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII (Proyecto INR-19/14).

7.3 Diseño experimental general

La Figura 8 resume el diseño experimental de todo el estudio.

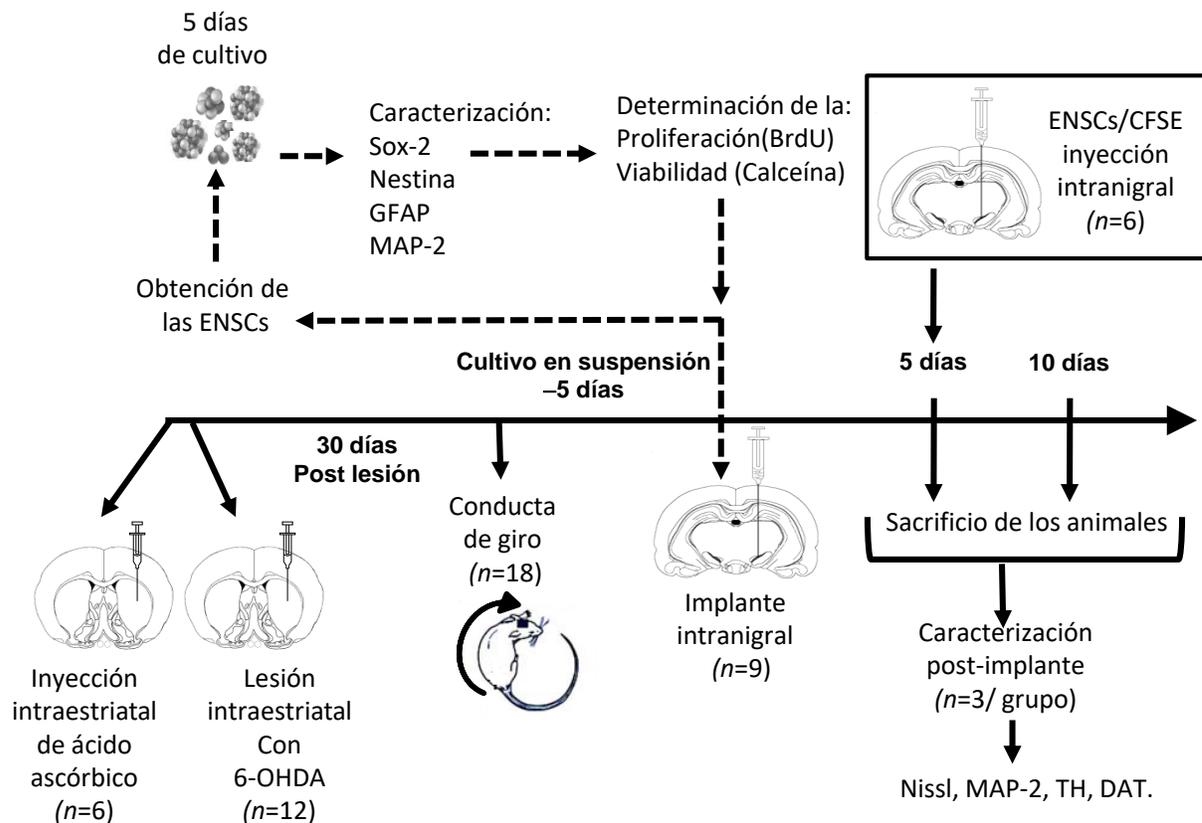


Figura 8. Esquema del diseño experimental. Las ENSCs en suspensión se obtuvieron 5 días antes del implante y se caracterizaron fenotípicamente. Las ratas adultas se lesionaron intraestriatalmente con vehículo y/o con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). El efecto tóxico de 6-OHDA fue validado en el día 28 posterior a la lesión a través de la prueba de conducta de giro, después de la administración de apomorfina (APO, 1 mg/kg, s.c.). Las ENSCs marcadas con CFSE se rastrearon en un experimento de implante paralelo. Para fines de restauración, las ENSCs se implantaron en la SNpc (3×10^5 células/ $2 \mu\text{L}$) 3 días después de que se realizó la prueba conductual. Los animales fueron sacrificados a los 5 y 10 días post-implante (DPI) en grupos de tres ratas por grupo. El análisis morfológico se realizó para cada grupo (Nissl), y los implantes se caracterizaron con marcadores neuronales (MAP-2) y DAérgicos (DAT y TH).

7.4 Cultivo celular, marcaje y caracterización

7.4.1 Aislamiento y cultivo en suspensión de ENSCs

Se utilizaron ratas neonatas de la cepa Wistar de 1 día de edad ($n=12$ ratas por cultivo). Los animales fueron sacrificados por decapitación. Con un hisopo se limpió el dorso del animal con yodo/alcohol 50/50, se realizó un corte en forma de “V” en la zona del peritoneo con tijeras rectas, cortando piel y músculo para que el intestino quede expuesto. Se extrajo el yeyuno (Belkind et al., 2013); con la ayuda de unas pinzas de relojero y un microscopio estereoscópico (Stemi 2000, Zeiss) se separaron mecánicamente las dos capas mucosa-submucosa y el plexo mientérico, y se colocaron en una caja de petri de vidrio estéril. Únicamente se recolectó el plexo mientérico, transfiriéndolo a un tubo de 15 ml con PBS y antibiótico al 10% en frío. En una campana de flujo laminar y en condiciones estériles, el plexo mientérico fue lavado con PBS/antibiótico al 10%. Posteriormente se fragmentó mecánicamente para ser procesado mediante digestión enzimática con una combinación de Dispasa tipo I (0.1mg/ml), Colagenasa tipo XI (750 U/ml) y DNasa I (10mg/ml), en agitación constante durante 20 minutos a 37°C (Suarez et al., 2004). Con una pipeta Pasteur de vidrio previamente humedecida con la enzima, se transfirió el tejido a un tubo de 1.5 ml que contenía 500 μ l de enzima de digestión. Posteriormente en el mismo tubo se realizó una dispersión mecánica con unas tijeras rectas (1 a 2 minutos y lo más fragmentado posible), se transfirió a un tubo de 15 ml (Corning) y se agregaron 2.5 ml de enzima (previamente calentada a 37° C) para tener un volumen final de 3 ml de enzima, y todo se dejó en agitación constante (215 rpm a 37°C por 15 minutos). Posteriormente,

se realizó una dispersión mecánica de la suspensión celular, haciéndola pasar por una pipeta Pasteur, y después por puntas de diferentes diámetros (200 y 1000 μl), y se centrifugó a 1200 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con medio basal NeuroCult, y la suspensión celular se hizo pasar a través de un colador celular con malla de nylon de 40 μm de poro; entonces se realizó el conteo celular mediante exclusión de azul tripano y se sembraron las células a una densidad de 7×10^5 células/ml en cajas individuales de baja adherencia (Corning) con medio de proliferación para células troncales que contenía medio NeuroCult con 10% de medio de proliferación suplementado con heparina al 0.0002%, EGF (20 ng/mL), bFGF (10 ng/mL) y antibiótico/antimicótico al 0.1%. Las colonias flotantes se mantuvieron por 5 días a 37°C y 5% de CO₂ (Figura 9).

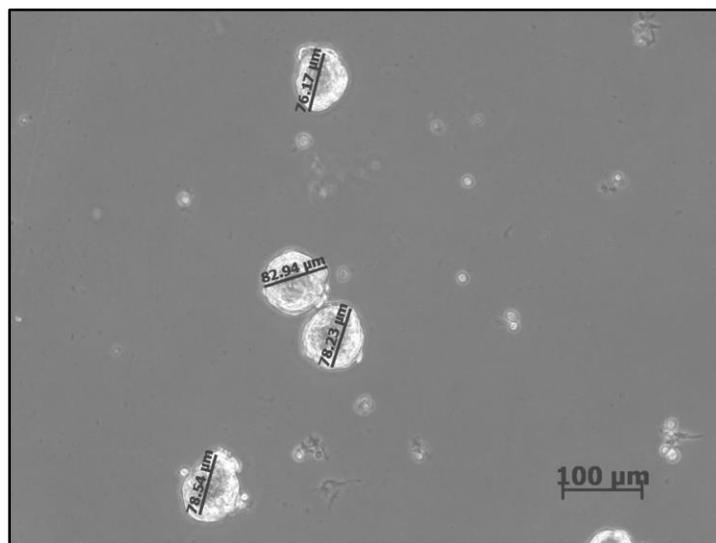


Figura 9. Cultivo de NSs en suspensión. La micrografía muestra NSs después de 5 días de cultivo, provenientes de plexo mientérico de ratas neonatas de 1 día de edad.

7.4.2 Determinación de la viabilidad celular de las ENSCs

La viabilidad celular se evaluó después de 5 días de cultivo utilizando el ensayo de muerte/vida con el kit comercial LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity, de acuerdo con las especificaciones establecidas por el fabricante. Este método se basa en la determinación de células vivas (color verde) indicada por la actividad de la esterasa intracelular (Calceína-AM), y de las células muertas indicada por la incorporación de homodímero de etidio-1 (EthD-1) al perder la integridad de la membrana plasmática (en color rojo). Se tomaron 3 ml del cultivo en suspensión, el cual fue centrifugado a 1200 rpm por 4 minutos; posteriormente se retiró el sobrenadante cuidando el pellet, se agregó 1 ml de solución Hank's, y se incubó por 10 min a 37°C, se agregó Calceína-AM (1µM) y el homodímero de etidio-1 (2 µM, EthD-1), y estos fueron incubados por 45 min a 37°C y centrifugados a 1200 rpm por 4 min. Se retiró el sobrenadante y se lavaron con PBS pH 7.4; el pellet fue resuspendido en 1 ml de PBS y analizado en un microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss). Se tomaron imágenes de cinco campos al azar, y las células vivas y muertas fueron analizadas con el Software AxionVision.

7.4.3 Determinación de la proliferación celular (BrdU) de las ENSCs

Después de 5 días de cultivo, se obtuvo una suspensión celular con 2×10^5 células/ml a las cuales se le adicionó una solución de marcaje con BrdU (10 µM, Kit FLUOS), dejando incubar las células por 60 min a 37°C y CO₂ 5%. Se centrifugó y se retiró el sobrenadante, se disgregó el pellet para hacer un lavado con 1 ml de medio Neurocult y nuevamente se

disgregó el pellet; en un portaobjetos tratado con Poli-L-Lisina se depositaron 10 µl de suspensión celular para hacer un frotis, el cual se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron fijadas con etanol 70%/glicina 50 mM, pH=2 durante 45 minutos a temperatura ambiente, se hicieron 2 lavados con PBS, se retiró el exceso y se dejó secar. Posteriormente, se agregó el volumen necesario de HCl 4M por 20 minutos a temperatura ambiente, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se agregó 50 µl de Anti-BrdU FLUOS; se dejó incubar por 45 minutos a 37°C en cámara húmeda y se hicieron tres lavados. Finalmente se agregó el volumen necesario de Hoechst [dilución 1:1000], dejando actuar por 1 minuto. Entonces se retiró y se agregó PBS. Se analizaron las muestras en un microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss) en un rango de 488 nm de excitación y 515 nm de emisión. Se tomaron cinco campos al azar y las imágenes fueron analizadas con el Software Axion Vision.

7.5 Denervación dopaminérgica con 6-OHDA

Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina (70mg/kg y 5mg/kg respectivamente), vía i.p. Las ratas se asignaron al azar y en la primera cirugía se formaron dos grupos experimentales: el grupo Sham ($n=6$) y el grupo lesionado con 6-OHDA ($n=12$). Para la denervación dopaminérgica, se inyectó 6-OHDA en el estriado dorsal, utilizando un aparato estereotáxico (Stoelting) con las siguientes coordenadas: antero posterior (AP) -1.0 mm de bregma, lateral (L) -3.2 mm a la línea media, y dorso ventral (DV) -5.0 con respecto a la dura madre según el atlas de Paxinos y Watson (1998). Al grupo Sham se le administró 2 µl de ácido ascórbico al 0.01% (vehículo de la 6-OHDA),

mientras que al grupo lesionado se le administró 2 μ l de 6-OHDA (10 μ g/ μ l) disuelta en ácido ascórbico al 0.01%. La inyección fue realizada a través de una micro-jeringa de 10 μ l (Hamilton) a una velocidad de 0.5 μ l/min, se dejó la aguja *in situ* durante 5 minutos, y posteriormente la cánula fue retirada. Después de la cirugía, todos los animales fueron colocados en un colchón térmico y mantenidos a 37°C para minimizar la hipotermia hasta su recuperación total, y posteriormente se les administró un tratamiento preventivo de Meglumina 2.5mg/kg v.o (analgésico) y Enrofloxacin 10mg/kg v.i. (antibiótico) por tres días. A los 30 días post-lesión se realizó la evaluación de la denervación dopaminérgica mediante la conducta de giro, administrando 1mg/kg de apomorfina (APO) vía s.c; las ratas lesionadas con 6-OHDA que tuvieron más de 8 giros/min fueron consideradas para la segunda cirugía.

7.6 Pellets y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en células cultivadas

Para poder realizar las IF, fue necesario formar un pellet de NSs incluidas en agarosa al 2%. Del cultivo en suspensión se tomó la totalidad del sobrenadante y se centrifugó a 12 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante, y el botón de NSs se transfirió a un tubo de 600 μ l, el cual nuevamente fue centrifugado a 1200 rpm por 5 min para retirar el sobrenadante. El botón celular fue resuspendido en 2 μ l de azul tripano para identificar a las NSs, y nuevamente fue centrifugado a 1200 rpm. A este botón de NSs se le agregó cuidadosamente 100 μ l de agarosa tibia y se dejó gelificar. Posteriormente, fue fijado en PFA 4% por 30 min a 20°C y procesado para incluirlo en parafina de acuerdo con el

procedimiento establecido; una vez incluido en parafina, se realizaron cortes de 7 μm que fueron adheridos en portaobjetos tratados con TESPA. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en alcoholes graduales, posteriormente fueron teñidos con Hematoxilina y diferenciados con alcohol ácido al 1%, después del lavado a chorro de agua por 5 minutos, las laminillas se pasaron a una solución saturada de carbonato de litio hasta obtener un color azul, se realizó un lavado a chorro de agua por 10 minutos, las laminillas se pasaron a etanol al 80%, posteriormente se realizó una contratinción sumergiendo las laminillas 2 veces en eosina, finalmente se hicieron pasar por alcoholes graduales para ser montados con resina.

7.7 Marcaje por inmunofluorescencia (IF) en células cultivadas

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en alcoholes graduales, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP [dilución 1:500], anticuerpo policlonal de conejo anti-Sox-2 [dilución 1:500], anticuerpo monoclonal de ratón anti-Nestina [dilución 1:500], y anticuerpo monoclonal de ratón anti-MAP-2 [dilución 1:500]. Después de 24 horas, las muestras se lavaron y se incubaron durante 2 horas a 37°C con el correspondiente anticuerpo secundario, FITC anti-conejo de cabra (IgG) fluorescente [dilución 1:1000] o Rojo Texas anti-ratón IgM de conejo [dilución 1:1000]. Los núcleos se tiñeron con Hoechst [dilución 1:1000] y se cubrieron con medio de montaje acuoso. Todas las preparaciones se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Imager AxioStar A1 (Carl Zeiss). Las imágenes se tomaron con una cámara AxioCamHRc y se procesaron con el software de

visión REL.4.8 Axio. En cuanto a la inmunofluorescencia, las imágenes se convirtieron a escala de grises y el porcentaje de área etiquetada y número de células para los diferentes marcadores se analizó con el software ImageJ 1.48v, teniendo en cuenta el área total de la micrografía.

7.8 Marcaje de las ENSCs pre-implante

Para demostrar que las ENSCs se implantaron en la SNpc, se utilizó el kit CFSE-Cell Labeling, de acuerdo con las especificaciones establecidas por el fabricante. Este método se basa en teñir a las células con 5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester (CFSE), un pro-tinte permeable, pero no fluorescente, en donde las estereasas intracelulares rompen los grupos acetato, dando como resultado la molécula carboxifluoresceina verde fluorescente impermeable a la membrana. El grupo éster de succinimidilo reacciona indiscriminadamente con aminas libres intracelulares para generar conjugaciones covalentes de colorante-proteína. A los 5 días de cultivo, se tomaron 3 ml del cultivo en suspensión, el cual fue centrifugado a 1200 rpm por 4 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante cuidando el pellet, se agregaron 500 µl de CFSE (10 µM) con PBS y se incubó por 15 minutos a 37°C. Posteriormente se agregaron 500 µl de medio de cultivo de proliferación durante 5 minutos, y nuevamente se centrifugó a 1200 rpm por 4 minutos. Se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 200 µl de medio proliferación, y se mantuvo a 37°C y 5% CO₂, hasta el momento en que las células fueron implantadas en la SNpc.

7.8.1 Implante de las ENSCs marcadas con CFSE

Un grupo de ratas Wistar adultas ($n=6$) fue anestesiado con Ketamina/Xilacina (70mg/kg/5mg/kg) vía i.p. El pellet de las ENSCs marcadas con CFSE fue inyectado en la SNpc bajo las siguientes coordenadas: AP= 5.3 mm de bregma, L=-2.2 mm de la línea media y DV= -6.9 con respecto a la dura madre (Paxinos and Watson, 1998). Las ratas fueron divididas en dos grupos: el primer grupo ($n=3$) fue sacrificado a los 3 días post implante y el segundo grupo ($n=3$) fue sacrificado a los 5 días post implante.

7.9 Implante de las ENSCs en la SNpc

Después de 30 días post-lesión con 6-OHDA, los animales se anestesiaron con Ketamina/Xilacina (70mg/kg y 5mg/kg) vía i.p. Se realizó una segunda cirugía esterotóxica para el implante de las ENSCs en la SNpc a una densidad de 3×10^5 células/2 μ l. Las células se centrifugaron a 1200 rpm por 4 minutos, el pellet se resuspendió en 2 μ l de medio de proliferación suplementado (StemCell) y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento del implante. Al grupo sham se le administró el vehículo celular ($n=3$). El grupo de 6-OHDA fue dividido en dos grupos: al primer grupo ($n=3$) se le inyectó el vehículo celular, mientras que al segundo grupo se le inyectaron las células ($n=6$). Los tratamientos se inyectaron en la SNpc bajo las coordenadas: AP= 5.3 mm de bregma, L=-2.2 mm de la línea media y DV= -6.9 mm con respecto a la dura madre (Paxinos and Watson, 1998).

7.10 Análisis histológico

Las ratas fueron sacrificadas a los 3 y 5 días después de haber implantado las células marcadas con CFSE, y a los 5 y 10 días post implante (DPI). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (43 mg/Kg) y se perfundieron vía intracardiaca con PBS (pH=7.4), y posteriormente con PFA al 4%, ambos en frío. Se retiraron los cerebros, se fijaron en PFA al 4% por 24 h a 4°C, y se deshidrataron e incluyeron en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 7 µm de espesor con un micrótomo (LeicaRM 2125RT), tomando el área de la zona anterior de aproximadamente entre -4.30 a -6.3 mm para la SNpc a partir de bregma. Las estimaciones se realizaron en 3 animales por tratamiento en 4 secciones por animal.

7.10.1 Tinción de Nissl

Los cortes histológicos de los diferentes grupos fueron desparafinados y rehidratados en alcoholes graduales. Para la tinción de Nissl, las laminillas se tiñeron con violeta de cresilo durante 20 minutos, se lavaron con agua bidestilada 2 veces, y se deshidrataron con alcoholes graduales para ser montados con resina. En las células normales se identificó la presencia de sustancia de Nissl en el citoplasma, cromatina suelta y nucléolos prominentes. Las células dañadas fueron identificadas por la pérdida de sustancia de Nissl, cavitación alrededor del núcleo, y por la presencia de núcleos picnóticos.

7.10.2 Inmunohistoquímica para TH

Para la identificación de TH, se agregó buffer de citratos 10 mM durante 20 minutos, seguida de una solución de metanol 10% con peróxido 3% /TBS por 30 minutos para inhibir la peroxidasa endógena, y se realizaron 3 lavados con TBS 0.1%. El bloqueo se realizó con suero de cabra (kit Vectastain ABC ELITE, PK6200) durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS 0.1%, se agregó el anticuerpo primario TH [dilución 1:300] toda la noche a 4°C, se realizaron 2 lavados con TBS al 0.1%, y se agregó el anticuerpo secundario biotilado [dilución 1:100] (kit Vectastain ABC ELITE). La preparación se incubó por 2 horas a 37°C, se realizaron dos lavados con TBS 0.1%, y se adicionó el conjugado de estreptavidina-peroxidasa (kit Vectastain ABC ELITE). Posteriormente, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con TBS 0.1%, y los cortes fueron revelados con DAB (3,3'-diaminobencidina). Se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris, y las preparaciones se deshidrataron y montaron con resina. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio estereoscópico Discovery. v20 (Carl Zeiss). Se tomaron fotografías a un aumento de 20x con un microscopio Imager Axiostar A1 (Carl Zeiss). Las tinciones se realizaron por triplicado para cada grupo experimental.

7.11 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron con la media \pm error estándar (S.E.M). Todos los datos fueron analizados estadísticamente por una prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. La prueba “t” de Student se utilizó para comparar el grupo de 6-OHDA de manera pareada con el grupo sham. Todos los procedimientos analíticos se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism v7. Las diferencias de $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativas.

8. Resultados

8.1 Corte de neuroesferas

Con la finalidad de verificar que las NSs se encontraban contenidas en el pellet para iniciar las IF, se realizó la tinción de H&E, en donde se puede ver los agregados celulares de diferentes tamaños que corresponde a un cultivo de 5 días, se puede observar en color azul los núcleos (Figura 10).

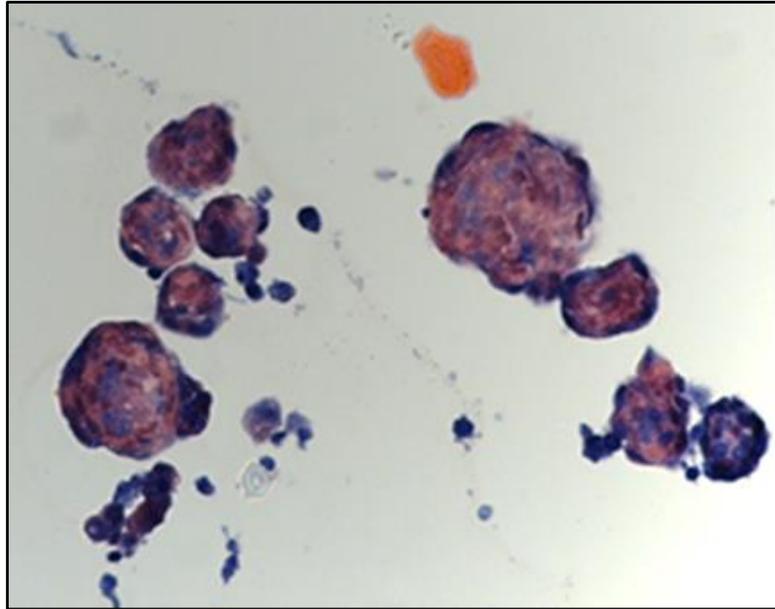


Figura 10. Neuroesferas teñidas con H&E. Se muestran las NSs de 5 días de cultivo que fueron incluidas en parafina y cortadas a 7 μm de espesor.

8.2 Las ENSCs en cultivo expresan marcadores de troncalidad

Las ENSCs del plexo mientérico de rata post-natal se analizaron en el día 5 de cultivo. Se observaron diferentes agregados celulares en suspensión (Figura 11A). Lo cual demostró que: 1) las ENSCs expresan las características de las células troncales, 2) son viables y 3) proliferan en el implante. La viabilidad de las ENSCs previo al implante se determinó con la prueba de calceína. Los grupos de células viables, que se tiñeron en verde, mostraron un porcentaje de viabilidad celular de $87\% \pm 3\%$, frente a un porcentaje en células no viables (en rojo) de $13\% \pm 4\%$, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos grupos (Figura 11B). Las ENSCs también demostraron ser proliferativas mediante la incorporación de BrdU al ADN (en verde) (Figura 11C). El porcentaje de células positivas para BrdU fue de $77\% \pm 2\%$ en comparación con los

agregados totales teñidos con Hoechst (azul), lo que indica que el ADN recién sintetizado está presente en la mayoría de las ENSCs (Figura 11E). Para confirmar que las ENSCs expresan las características de las células troncales, se evaluó el número de células positivas a diferentes marcadores específicos de células troncales (Figura 11D). Los siguientes marcadores se determinaron como porcentaje de células positivas del total (células marcadas con Hoechst): GFAP positivo ($41\% \pm 2\%$; $p \leq 0.01$), Sox-2 ($81\% \pm 2\%$; $p \leq 0.01$), Nestin ($42\% \pm 2\%$; $p \leq 0.01$) y MAP-2 ($73\% \pm 2\%$), todos diferentes de Hoechst (Figura 11F).

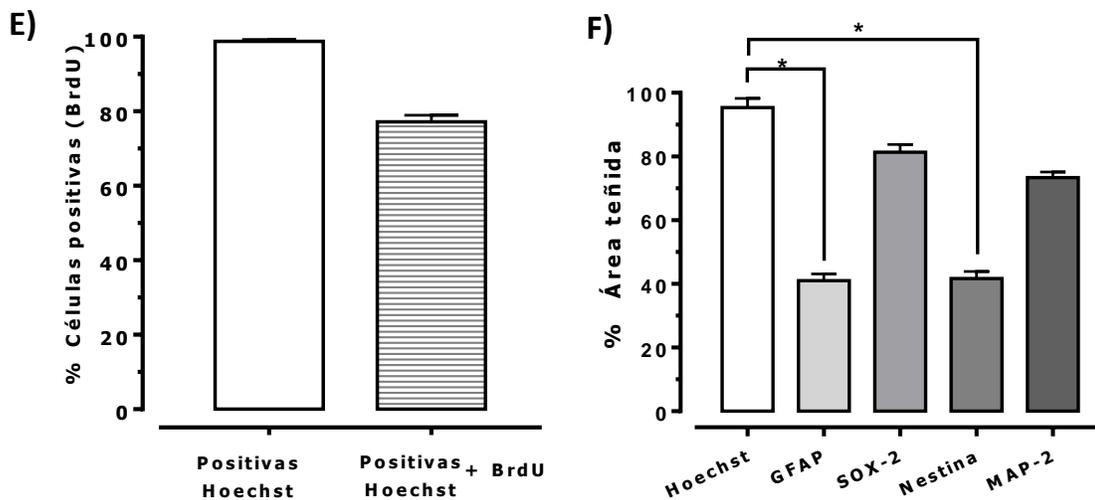
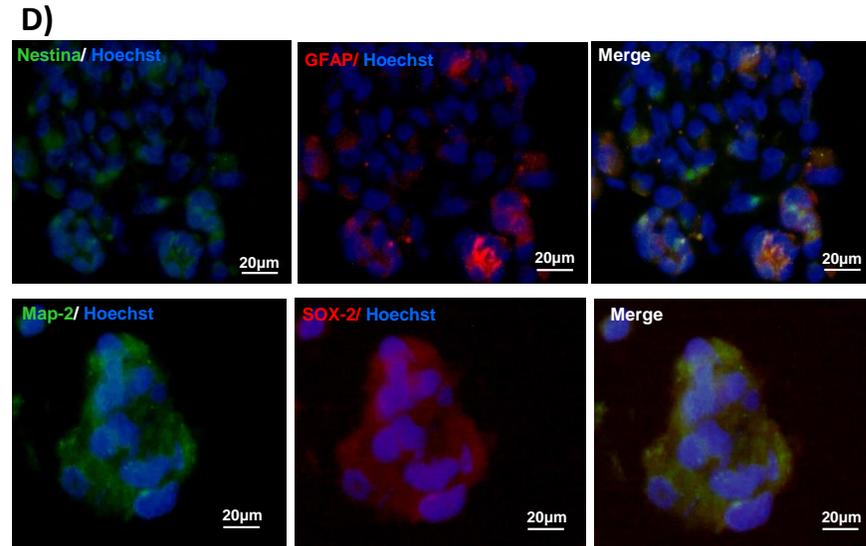
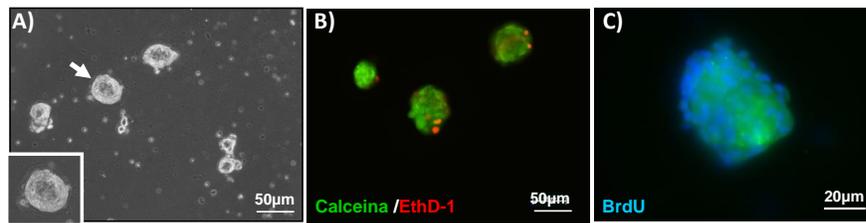


Figura 11. Caracterización de las ENSCs de ratas post natales en cultivo. **A)** La micrografía muestra un cultivo en suspensión de 5 días de ENSCs provenientes del plexo mientérico; **B)** Células vivas teñidas con calceína (verde) y células muertas positivas para el homodímero de etidio-1(rojo).**C)** incorporación de BrdU (verde) en las NSs, indica el ADN recién sintetizado después de 5 días de cultivo. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul); **D)** porcentaje de ENSCs positivas para BrdU de las células totales; **E)** secuencia de micrografías que muestran ENSCs positivas a diferentes marcadores de troncalidad (GFAP, SOX-2, Nestina y MAP-2; **F)** La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a marcadores de troncalidad * $p \leq 0,01$ diferente de Hoechst.

8.3 Análisis histológico

Para evaluar la extensión del daño neuronal causados por la 6-OHDA y los cambios morfológicos por el implante de las ENSCs, se evaluó la tinción de Nissl en la SNpc de ratas sometidas al modelo de lesión retrógrada y de ratas con el implante de ENSCs intranigrales. Para el primer caso, se observó una atrofia y degeneración lenta y progresiva de las neuronas DAérgicas de la SNpc observadas 30 días después de la inyección intraestriatal de la neurotoxina, que corresponde a una degeneración neuronal retrógrada secundaria a la lesión terminal nigroestriatal DAérgica. Según los reportes de la literatura, este modelo representa una etapa temprana de la EP (Sauer y Oertel, 1994; Przedborski et al., 1995), y se representa en la Figura 12A. Al inducir una degeneración DAérgica en la SNpc, fue posible observar que las células y fibras positivas para TH están ausentes en la región dorsal de la SNpc ipsilateral a la lesión (Figura 12C), en comparación con el grupo sham (Figura 12B), donde las fibras se observan claramente. La Figura 12D muestra el sitio de la lesión mecánica donde se implantaron las ENSCs (micrografía izquierda). Se incluye una ampliación de este sitio (micrografía derecha, Figura 12D). Cabe señalar que las imágenes incluyen tanto el sitio de la lesión, como el área adyacente al implante, aunque el análisis histológico e histoquímico detallado consideró solo el área adyacente del implante en la SNpc. Se analizó el número de células teñidas en el área adyacente de 3 animales por tratamiento y 4 secciones por animal.

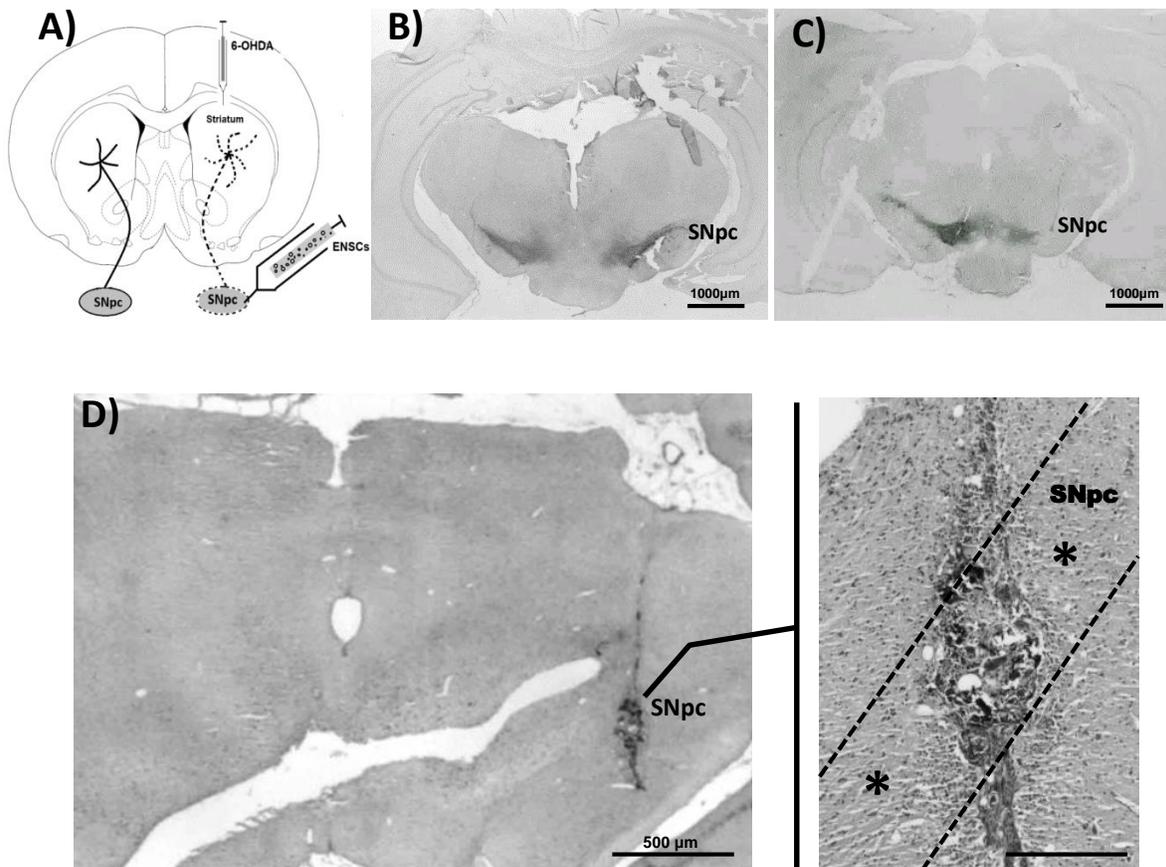


Figura 12. Pérdida de células DAérgicas e implantes ENSC en la SNpc. **A)** La inyección unilateral de 6-OHDA estriatal genera un modelo retrógrado de denervación DAérgica. El modelo está esquematizado y muestra el sitio de la lesión en el cuerpo estriado y el sitio donde se implantaron los ENSCs en la SNpc; **B)** tinción con TH en la SNpc de una rata Sham representativa que muestra el tracto DAérgico intacto (células y fibras) en ambas áreas nigrales (izquierda y derecha) en gris oscuro; **C)** ausencia de un tracto TH positivo en la SNpc derecho (lado ipsilateral de la lesión 6-OHDA), en comparación con el tracto intacto del lado izquierdo (contralateral a la lesión 6-OHDA); **D)** sitio de implante ENSCs en la SNpc; la micrografía izquierda muestra una vista general del corte del cerebro, mientras que el panel derecho muestra una ampliación del sitio del implante y las áreas adyacentes tomadas de la imagen original de la izquierda. Para fines analíticos, solo se consideraron las áreas adyacentes (asteriscos).

El área perteneciente a la SNpc se delimitó para considerar solo aquellas células que se ubicaron dentro de esta región (Figura 13A; 20x). En el momento del análisis, el número de células para el grupo Sham fue de 18 ± 1 , mientras que solo se contaron 9 ± 1 células en el grupo 6-OHDA ($p \leq 0,0001$; diferente de Sham). Para los grupos 5 y 10-DPI, el número de células teñidas fue de 15 ± 1 y 17 ± 1 , respectivamente ($p \leq 0,001$ y $p \leq 0,0001$), siendo diferente del grupo 6-OHDA (Figura 13B). Las diferencias morfológicas neuronales encontradas entre cada grupo experimental se detalla en la Figura 14.

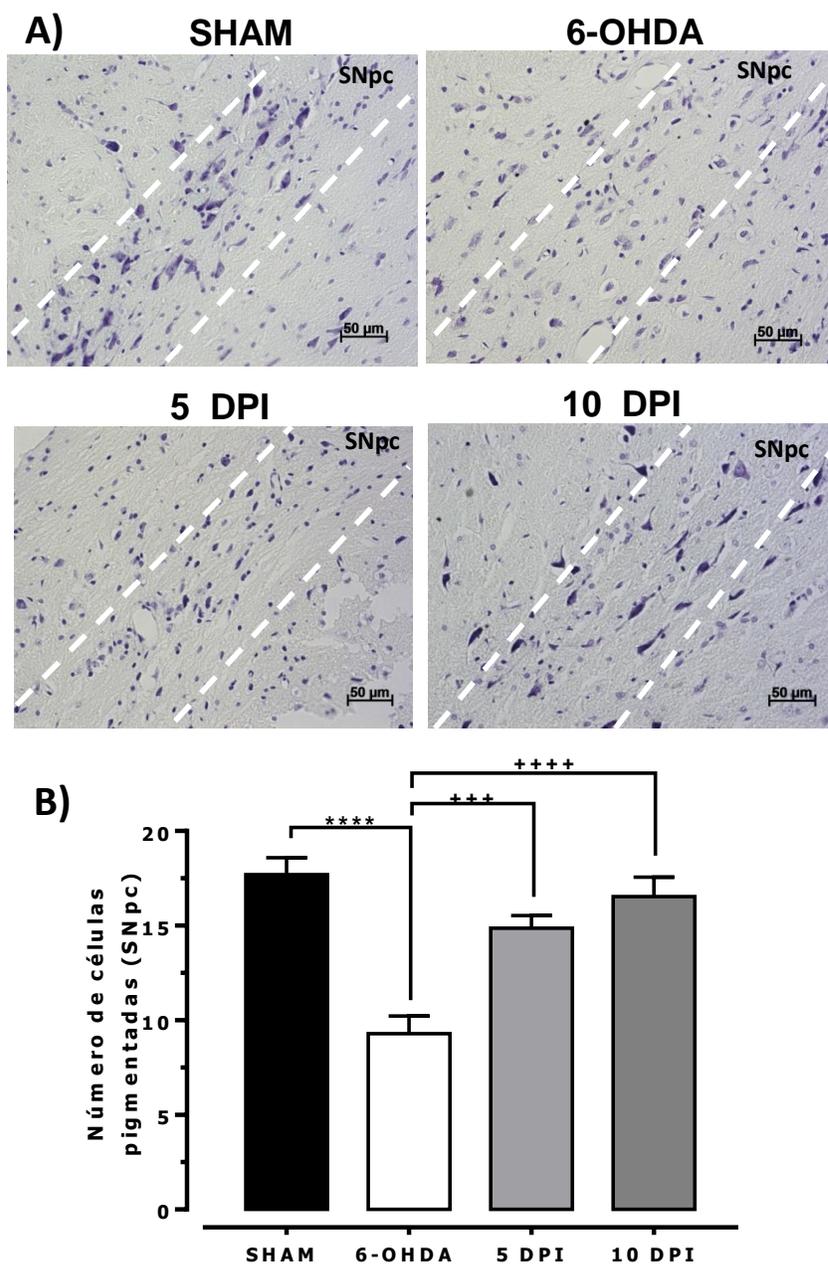


Figura 13. Cambios morfológicos en la SNpc de ratas lesionadas con 6-OHDA. En **A)** las células picnóticas y la desorganización de los neuropilos se observan en la SNpc del grupo lesionado con 6-OHDA, en contraste con las células bien conservadas del neuropilo en el grupo Sham. Las células en la SNpc disminuyen por el efecto retrógrado de la lesión estriatal de 6-OHDA en comparación con el grupo Sham. Se pueden ver células neuronales en la SNpc a los 5 y 10 días posteriores al implante. En **B)** El número de células neuronales (pigmentadas) en la SNpc de animales simulados se compara con el de los grupos 6-OHDA, 5 y 10 DPI. **** $p \leq 0.0001$, diferente de Sham +++ $p \leq 0.001$ y +++++ $p \leq 0.0001$, diferente de 6-OHDA.

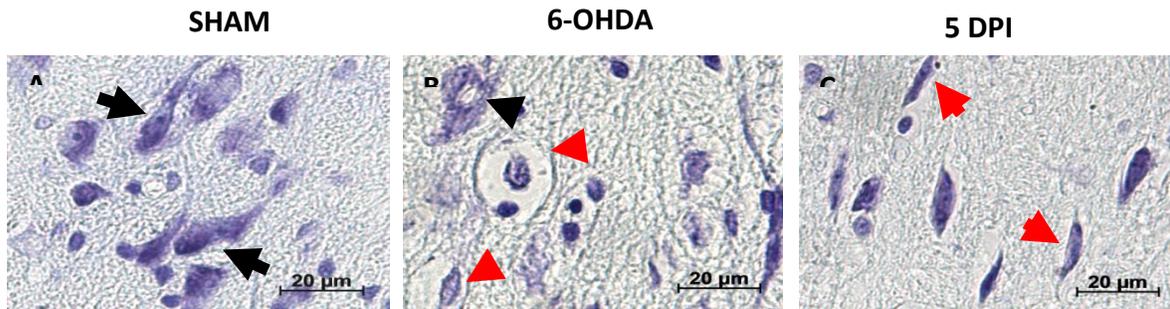


Figura 14. Detalles de la morfología neuronal en la SNpc. La imagen muestra diferentes detalles morfológicos neuronales encontrados en la SNpc de todos los grupos experimentales. **A)** Células neuronales con soma bien conservado, citoesqueleto y núcleo integral, así como retículo endoplasmático pigmentado en el grupo Sham; **B)** Contracción nuclear y condensación de cromatina en respuesta a la lesión retrógrada de 6-OHDA (punta de flecha roja), acompañada de desorganización neuronal (punta de flecha negra) y neuropilo; **C)** Células neuronales con soma, citoesqueleto y núcleos íntegros, acompañadas de un pequeño soma alargado, con un citoplasma intensamente pigmentado (flecha roja) en la SNpc del grupo 5-DPI.

8.3.1 El implante de las ENSCs permanece en la SNpc y modifica su morfología

Para demostrar que el implante ENSCs permaneció en la SNpc y puede adaptar su morfología al microambiente local, las células se marcaron con CFSE antes del implante, y luego se siguieron durante 3 y 5 días en animales no lesionados. El marcaje con CFSE también se usó para determinar la viabilidad celular. La Figura 15A muestra que las ENSCs permanecieron cerca del sitio del implante a 3 DPI, sin cambiar su morfología original. El marcaje también mostró que los ENSCs implantados eran viables a 3 DPI. El seguimiento de las células marcadas con CFSE a 5 DPI muestra que las células desarrollaron cambios morfológicos, presumiblemente como una respuesta adaptativa al entorno nigral (Figura 15B). También se observó que, aunque con una marca menos intensa, posiblemente debido a la pérdida de señal fluorescente,

los restos (pequeños gránulos verdes) de CFSE (indicado por flechas blancas) permanecieron en el citoplasma, lo que indica que estas células corresponden con las ENSCs implantadas. Las ampliaciones del campo a 5 DPI se muestran en el panel inferior (Figura 15 B). La cuantificación de las células CFSC + Hoechst positivas se comparó con el total de células marcadas con Hoechst, mostrando que alrededor del 11% del total de células presentes en la región nigral correspondía a células implantadas.

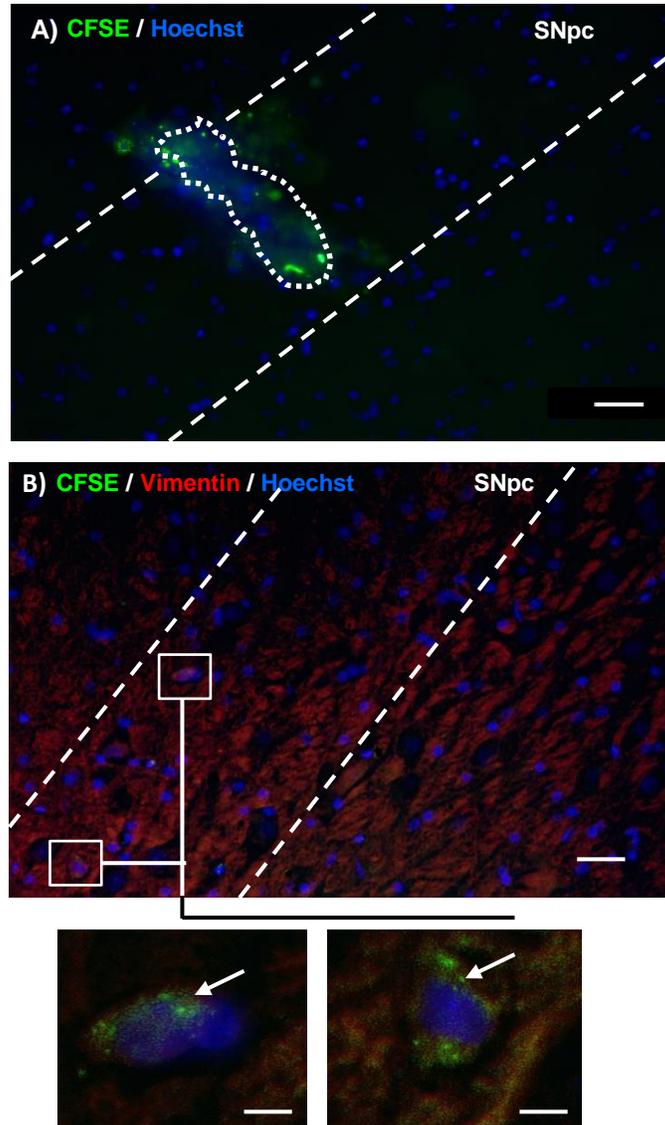


Figura 15. Las ENSCs implantados permanecen en la SNpc y cambian su morfología. En un ensayo independiente, las ENSCs se tiñeron previamente con CFSE antes del implante, y se les dio seguimiento durante 3 y 5 días en la SNpc de ratas no lesionadas. **A)** Se observa un grupo de ENSCs teñido con CFSE a 3 DPI, que muestra que las células permanecieron cerca del sitio del implante y son viables; **B)** Las ENSCs marcadas mostraron cambios morfológicos que podrían corresponder a modificaciones adaptativas; estas células todavía mostraban el marcador CFSE a 5 DPI, lo que indica que estas células se diferencian y permanecen en el sitio de implante (escala de la barra 20 μ m). En el panel inferior, se muestra un aumento (zoom digital) de las células implantadas de B).

8.4 La expresión de MAP-2 incrementó en la SNpc de ratas implantadas con ENSCs

Se cuantificó la expresión y el número de células inmunoreactivas a MAP-2, que denotan la presencia de células neuronales para cada grupo experimental (Figura 16). La inmunoreactividad positiva contra MAP-2 (evidenciada como marcaje verde alrededor de los núcleos azules) se mostró en las células de los grupos Sham, 5 y 10 DPI, pero solo moderadamente en el grupo 6-OHDA (Figura 16A). En la Figura 16B, el número de células positivas para MAP-2 para el grupo 6-OHDA (3 ± 0.3 por campo) disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en comparación con el grupo Sham (10 ± 0.3). Se encontró un aumento en el número de células neuronales positivas para MAP-2 en los grupos 5 y 10 DPI (5 ± 1 y 7 ± 1 , respectivamente), con respecto al grupo 6-OHDA.

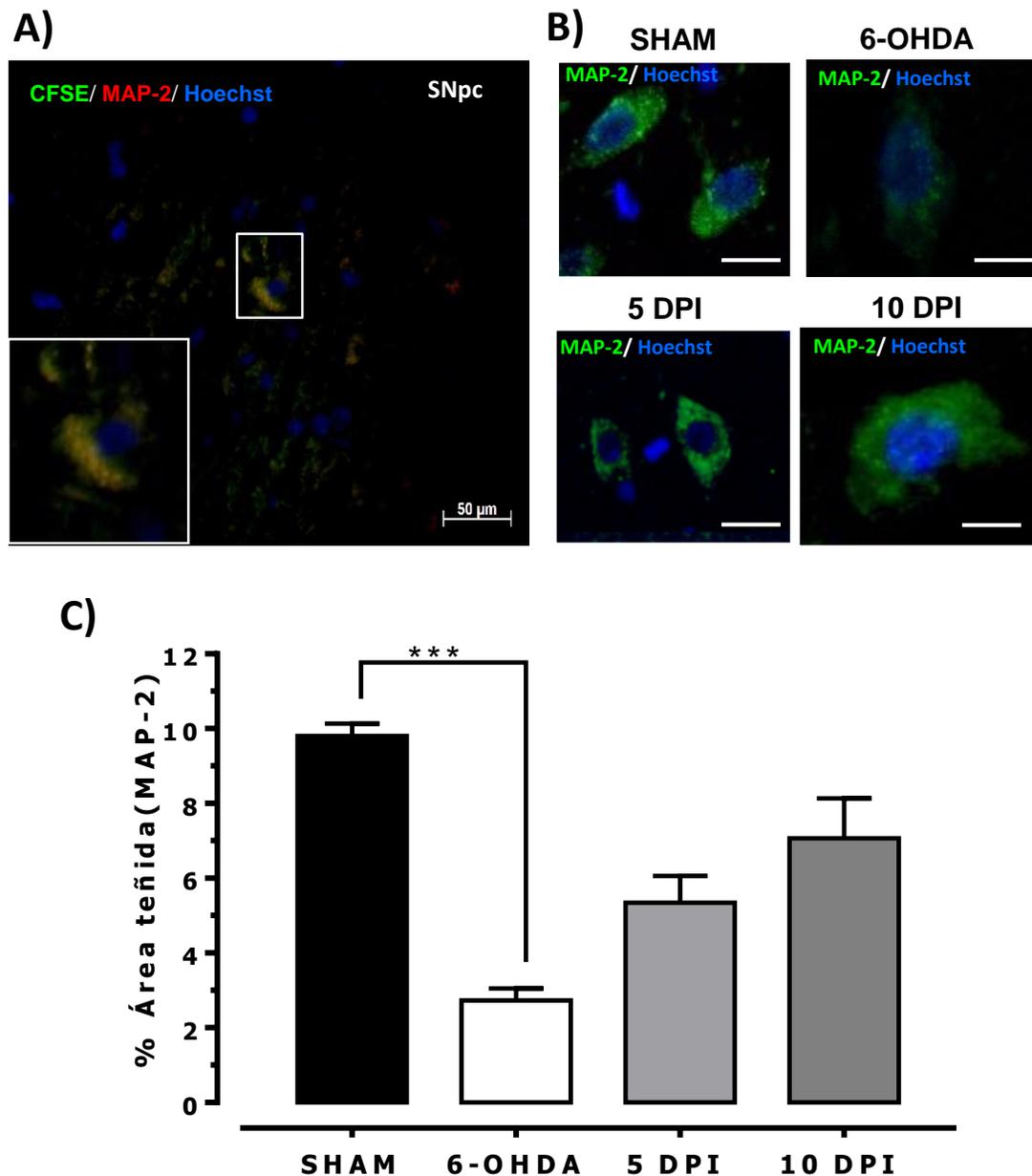


Figura 16. Las células inmunopositivas a MAP-2 prevalecen en la SNpc de ratas implantadas con ENSCs. Los cortes de tejido obtenidos de los diferentes grupos experimentales se inmunotñieron contra la proteína neuronal MAP-2 (verde); el Hoechst (azul) se utilizó para contrastar los núcleos. **A)** Micrografía que muestra que las células tomadas del cultivo original están presentes y permanecen en el tejido nigral a 5 DPI; **B)** Las micrografías muestran células positivas a MAP-2 (Sham, 5 y 10 DPI) del área adyacente al sitio del implante en la SNpc (escala de la barra 50 µm); **C)** El gráfico muestra el porcentaje de área teñida para células inmunoreactivas a MAP-2 en la SNpc de los diferentes tratamientos experimentales. *** $p \leq 0.001$, diferente del grupo Sham.

8.5 La expresión de DAT incrementó en la SNpc de ratas implantadas con ENSCs

Cuando se evaluó la expresión de DAT en los grupos implantados, se encontraron células inmunoreactivas a DAT en el área adyacente al implante (SNpc) en cortes de los diferentes grupos experimentales. En los grupos Sham, 5 y 10 DPI, se encontró intracelularmente y en la membrana la presencia de DAT (Figura 17A). Se halló una expresión moderada de DAT en las células restantes del grupo 6-OHDA. El número de células positivas a DAT por campo (Figura 17B) del grupo de 6-OHDA (3 ± 0.5) disminuyó ($p \leq 0.001$) en comparación con el grupo Sham (7 ± 1). Para los grupos 5 y 10 DPI, el número de células positivas a DAT aumentó en comparación con el grupo 6-OHDA (6 ± 0.5 y 5 ± 1).

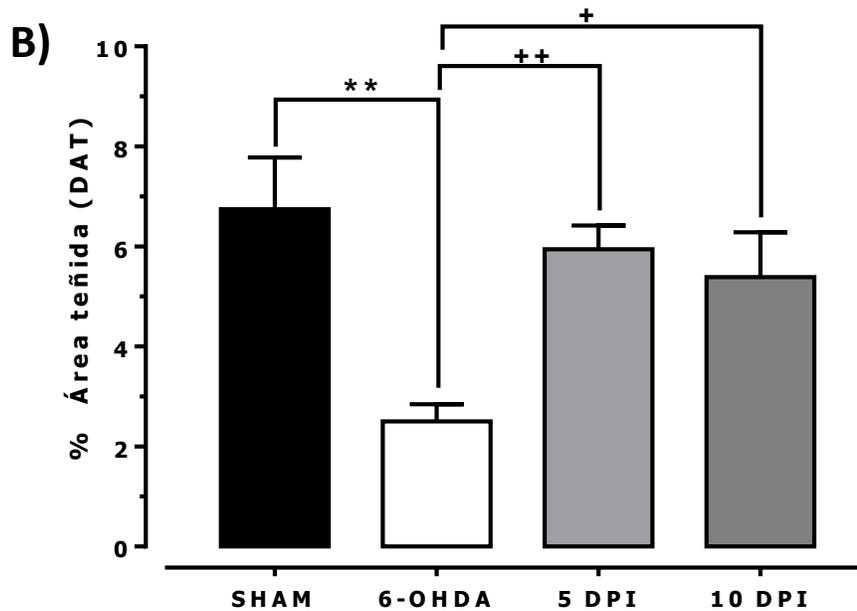
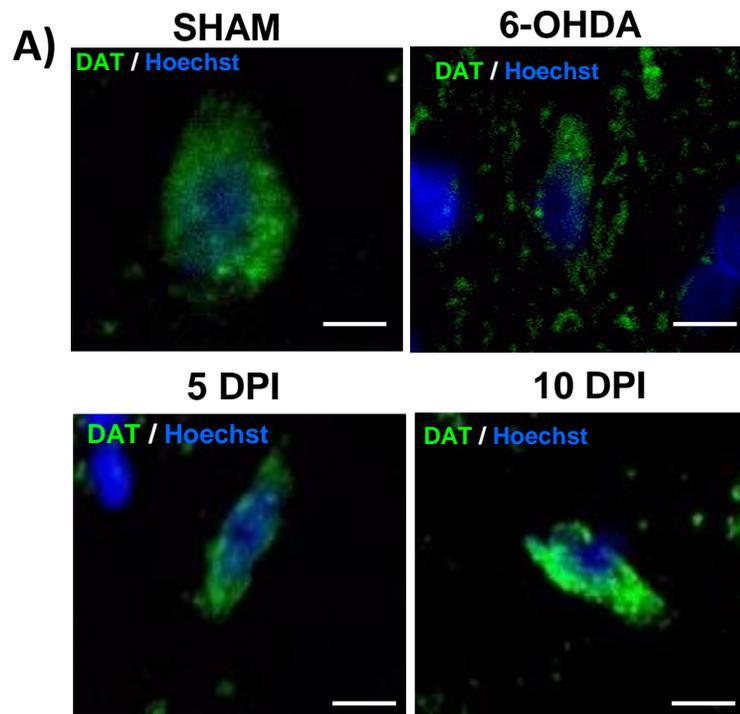


Figura 17. La SNpc de animales implantados con ENSCs expresa DAT. Las muestras de tejido se inmunotñieron para DAT (verde) y los núcleos con Hoechst (azul). **A)** Las células adyacentes al implante que expresaban DAT eran prominentes en los grupos Sham, 5 y 10 DPI, y moderadas y difusas en el grupo 6-OHDA; **B)** El gráfico muestra el número de células positivas a DAT por campo en los diferentes grupos experimentales. ** $p \leq 0.001$, diferente de Sham; + $p \leq 0.05$ y ++ $p \leq 0.001$, diferente de 6-OHDA. Escala de la barra 50 μm .

8.6 Las ENSCs implantadas incrementan la expresión de TH en la SNpc

Se evaluó la inmunoreactividad a TH y el recuento celular en la SNpc en los diferentes cortes de los grupos experimentales (Figura 18). Se observaron cuerpos celulares de tamaño mediano con bifurcaciones dendríticas -características de las células DAérgicas- (Figura 18A, ver detalles en los recuadros). También se determinó el porcentaje de área marcada para TH (Figura 18B). La inmunoreactividad basal (grupo Sham) fue de $92\% \pm 8\%$, mientras que el valor de la inmunoreactividad para el grupo 6-OHDA fue de alrededor de $35\% \pm 9\%$, siendo significativamente menor ($p \leq 0.001$) que el grupo Sham. Cuando se analizó el porcentaje de área positiva a TH para los grupos de implantes, se encontró un aumento significativo de $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.001$ para 5 y 10 DPI ($84\% \pm 5\%$ y $90\% \pm 4\%$, respectivamente).

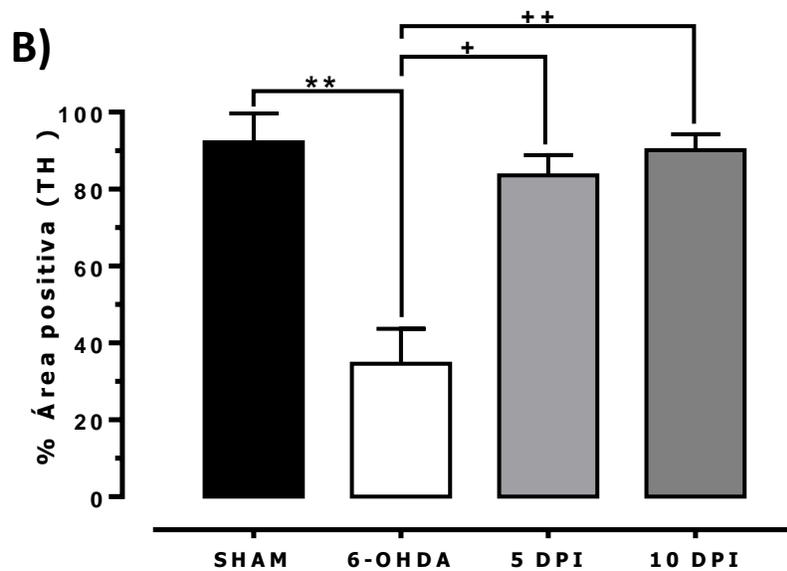
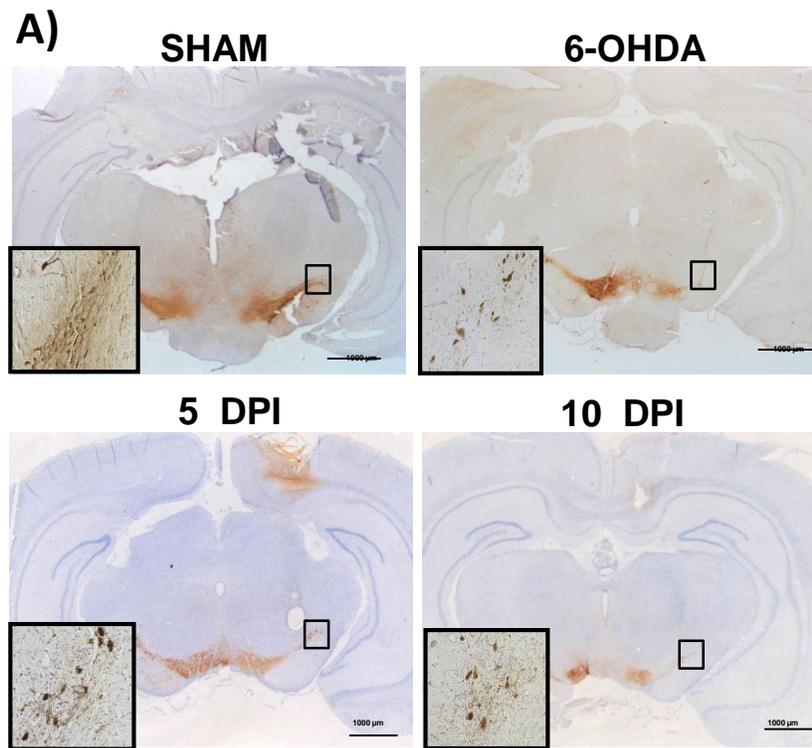


Figura 18. Las ENSCs implantadas aumentan la expresión de TH en la SNpc. A) Las micrografías muestran células inmunoreactivas a TH (marrón) en la SNpc de ratas Sham, 6-OHDA, 5 y 10 DPI; **B)** El gráfico muestra el porcentaje de área positiva a TH para cada grupo experimental. ** $p \leq 0.001$, diferente de Sham; + $p \leq 0.05$ y ++ $p \leq 0.001$, diferente de 6-OHDA.

9. Discusión

Este trabajo es el primero en investigar la eficacia del implante de ENSCs en la SNpc en un modelo neurotóxico retrógrado producido por la inyección intraestriatal de 6-OHDA a ratas. Se evaluaron los cambios morfológicos y neuroquímicos a 5 y 10 DPI para evaluar la viabilidad de las ENSCs implantadas en los animales lesionados. En términos generales, nuestros resultados proporcionan evidencia de supervivencia, proliferación y diferenciación de estas células después de su implante. Varios estudios han confirmado la presencia de las SC y progenitoras multipotenciales adultas en el SNE, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, a través de la presencia de diferentes marcadores expresados a diferentes edades de los individuos. Young y cols. (2003) mostraron que aproximadamente entre el 5 y el 10% de los marcadores, incluidos PGP9.5 y S100b, que son específicos para las células neuronales y gliales respectivamente, se expresan en los ganglios linfáticos mientéricos post-natales del intestino delgado y grueso en el día cero de nacimiento. La evidencia previa ha demostrado que el nicho de las SCs en el SNE se encuentra entre el plexo mientérico y la capa muscular longitudinal del intestino, y que, cuando se estimula el receptor 5-HT4 (el subtipo de receptor de serotonina que regula la secreción y la motilidad gastrointestinal) la supervivencia de las células entéricas, el proceso neurogénico y la expresión de marcadores de precursores neuronales y factores de transcripción (incluidos Sox-10, Nestina y PHOX2B) aumentan, mientras que la apoptosis celular disminuye (Liu et al., 2009), lo que demuestra la presencia de neurogénesis entérica en adultos.

En este contexto, el cultivo de ENSCs a partir del plexo mientérico de rata postnatal nos permitió obtener NSs que expresaban marcadores de troncalidad (GFAP, Sox-2, Nestina y MAP-2). Estos resultados son consistentes con lo sugerido por Kempermann y cols. (2004) con respecto a la expresión de diferentes marcadores que son característicos de las células neuronales en varias etapas de diferenciación. La expresión de GFAP y Sox-2 en nuestros experimentos sugiere que las ENSCs están en proceso de diferenciación, ya que la expresión de esta proteína glial denota la presencia de SCs, mientras que la expresión de Nestina sugiere que parte de las ENSCs se están diferenciando tempranamente (escenario de células neuronales). Nuestros resultados también mostraron un aumento en la expresión de Sox-2, un factor de transcripción que es esencial para el mantenimiento, la diferenciación y la proliferación de ENSCs en la etapa adulta. A su vez, la mayor expresión de MAP-2 sugiere que las ENSCs implantadas están comprometidas con un linaje neuronal maduro. En conjunto, estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados por Hagl y cols. (2013), quienes demostraron que el co-cultivo de las NSs entéricas expresa marcadores de células troncales, tales como Nestina, Nanog, Sox-2 y Oct4, así como marcadores de células diferenciadas y maduras, incluidas la β -tubulina III y TH. En este contexto, nuestros resultados también sugieren que el SNE aloja células troncales/progenitoras que pueden dar lugar a subtipos neuronales y gliales, lo que convierte a este sistema en una fuente y herramienta valiosa para obtener células que podrían diferenciarse en linajes especializados.

Nuestra hipótesis se validó al confirmar que las células cultivadas expresaron marcadores de células troncales, que son viables y que pueden proliferar una vez que estas son implantadas en la SNpc. Al principio, se supuso que, una vez implantadas, las ENSCs encontrarían las condiciones adecuadas en el nicho para permanecer, sobrevivir y diferenciarse en un linaje neuronal DAérgico. Esta consideración se basa en la evidencia que muestra que, a pesar de que un insulto tóxico inducido por 6-OHDA puede afectar el sistema DAérgico en la SNpc, el nicho aún contiene factores neurotróficos y de transcripción necesarios para estimular la supervivencia, y los procesos de proliferación y diferenciación (Chauhan et al., 2001). Esta característica, junto con las propiedades intrínsecas de las células implantadas, constituye un fuerte apoyo para el diseño futuro de terapias basadas en el reemplazo celular en áreas cerebrales dañadas. Sin embargo, aún hay varios problemas que resolver para esta estrategia, el más importante es cómo realizar la inyección de las células con factores neurotróficos necesarios para mejorar su establecimiento funcional y su viabilidad a largo plazo durante el implante. Este tema necesita más investigación en el modelo estudiado en este trabajo.

Por otro lado, en este estudio se utilizó un modelo tóxico retrógrado. Este modelo implica la inducción de una lesión DAérgica lenta y progresiva similar a la observada en la EP temprana. La evidente pérdida de células y fibras TH positivas, junto con la presencia de células picnóticas y la disminución de las células pigmentadas de la SNpc, proporcionan evidencia del daño progresivo causado por 6-OHDA en el modelo tóxico; sin embargo, en la SNpc, no todas las células DAérgicas se ven afectadas por 6-OHDA, ya que hay una subpoblación en el área dorsal de esta región que expresa

proteínas que se unen al calcio, como la calretinina y la calbidina. Estas proteínas ayudan a prevenir la acumulación de calcio intracelular, evitando posteriormente la excitotoxicidad del glutamato y la neurotoxicidad de la 6-OHDA (Nemoto et al., 1999; Tsuboi et al., 2000). Por esta razón, elegimos dicha área como el sitio del implante, ya que consideramos que este remanente de células es necesario para establecer la interacción con las células implantadas, y esta interacción podría reclutar las acciones de citocinas, quimiocinas y morfógenos, enriqueciendo así el nicho (Morrison y Spradling, 2008). Por lo tanto, planteamos también la hipótesis de que el contenido enriquecido del nicho contribuye a facilitar la adaptación de las ENSCs implantadas, al menos durante los primeros 5 a 10 días posteriores al implante. En apoyo a esta consideración, en nuestro estudio, cuando se realizó un análisis morfológico, se encontró un aumento en el número de células en el área adyacente al sitio del implante a los 5 y 10 días posteriores al implante. Por lo tanto, es probable que las ENSCs se implantaran en un nicho apropiado, de modo que pudieran diferenciar, migrar y ocupar un área adyacente al sitio del implante, donde encontraron las condiciones necesarias para seguir un patrón de diferenciación en la etapa terminal celular. Esto fue corroborado por el marcaje con CFSE y el seguimiento adicional de ENSCs después de 5 días posteriores al implante, lo que demostró la integración de las células con remanentes de CFSE en la SNpc y su expresión de un fenotipo neuronal. Además, en función de las características morfológicas observadas para estas células, se puede suponer que, a pesar de que ya están comprometidas con un linaje neuronal, estas células aún permanecen en un proceso de diferenciación temprana. En este punto, era evidente, de acuerdo con nuestros resultados morfológicos, que las condiciones del

implante eran apropiadas. Sin embargo, el fenotipo neuronal basado en características bioquímicas era necesario para respaldar nuestras observaciones. Por lo tanto, se determinó la expresión de MAP-2, DAT y TH. La expresión de MAP-2 aumentó después de 10 DPI, lo que sugiere que las ENSCs pueden diferenciarse previamente en células neuronales durante dicho período. Este hallazgo indica que estas células conservan sus propiedades multipotentes en un entorno similar al de su origen, lo que significa que el SNE comparte condiciones ambientales con la SNpc. En este sentido, nuestros resultados son consistentes con los reportados por Zhang y cols. (2003), quienes mostraron que las células de la zona subventricular (SVZ) implantadas en el estriado adulto se diferencian en interneuronas, lo que demuestra que las células que se implantan incluso en un microambiente diferente al de su origen pueden diferenciarse hacia un linaje neuronal si encuentran condiciones apropiadas.

Cuando se evaluó la inmunoreactividad contra dos marcadores dopaminérgicos, DAT y TH, para mostrar resultados funcionales de las células implantadas, se encontró una población de células positivas para estos marcadores, lo que sugiere que las células implantadas y parcialmente diferenciadas son aparentemente funcionales, al menos durante los primeros 10 DPI. Estos hallazgos contrastaron con el escenario esperado producido por la única lesión con 6-OHDA, donde se encontraron fibras denervadas inmunoreactivas a TH en el cuerpo estriado y una marcada degeneración de las neuronas DAérgicas en la SNpc. Se ha informado que una dosis única de 6-OHDA en el cuerpo estriado conduce a una reducción del 80% en la inervación estriatal, y a una pérdida del 90% de la población DAérgica (Blum et al., 2001; Saito et al., 2007). Al considerar en conjunto la inmunoreactividad contra TH y la expresión de DAT a 5 y 10

DPI en los grupos implantados, es probable suponer que las ENSCs se diferencien en un linaje DAérgico. Las ENSCs derivan de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, por lo que comparten el mismo origen que las células del SNC y, por lo tanto, mantienen su potencial para diferenciarse en células DAérgicas específicas en la SNpc. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hagl y cols. (2013), quienes mostraron que las ENSCs del apéndice humano migran y se diferencian hacia células positivas para TH y β -tubulina III después de 4 días de cultivo, cuando se cultivan en la capa cortical del cerebro de la rata. Sus resultados también demostraron el potencial del SNE como fuente autóloga de células troncales neurales. De igual manera, el reporte mostró que las condiciones apropiadas son esenciales para que las ENSCs se adapten, diferencien y permanezcan funcionales, una vez implantadas en un microambiente similar al que provienen (Almond et al., 2007).

Finalmente, en apoyo adicional a los prometedores resultados de este estudio, se han propuesto diferentes fuentes de células DAérgicas para implantes, incluyendo células fetales del mesencéfalo ventral (CMV), células troncales embrionarias (ESC) y células pluripotentes inducibles (iPSC), entre otros (Fjodorova et al., 2017; Chang et al., 2012; Takahashi et al., 2007). Sin embargo, este tipo de fuentes e implantes presentan desventajas en comparación con las ENSCs, como diversas implicaciones éticas para su adquisición, la disponibilidad restringida de tejido fetal, la contaminación celular frecuente (mezcla de células de otros linajes) o incluso la formación de teratomas (Brederlau et al., 2006; Chang et al., 2012). A este respecto, aquí hemos demostrado que la fuente de producción de ENSCs es viable, no hay restricción en la

obtención de las células, por lo que el SNE puede considerarse como una fuente adecuada para obtener células autólogas para reparación del sistema DAérgico.

10. Conclusión

El SNE es una fuente valiosa de células que pueden diferenciarse a corto plazo en células con fenotipo neuronal DAérgico. Este estudio mostró, por primera vez, que bajo condiciones adecuadas para el cultivo e implante de las ENSCs en la SNpc de ratas lesionadas con 6-OHDA, las células pueden sobrevivir, diferenciarse y proliferar a corto plazo, demostrándolo mediante la caracterización y fenotipificación DAérgica, lo que apoya el concepto de que las ENSCs se diferenciaron hacia un fenotipo esperado para reemplazar las células de la SNpc que fueron dañadas por una lesión neurotóxica, similar a las observadas en los trastornos neurodegenerativos, como lo es la EP.

11. Perspectivas

En el presente estudio establecimos, de manera detallada, las condiciones del implante, de tal forma que estamos haciendo una contribución sólida y original, no solo a través de diferentes resultados evaluados para validar este modelo, sino también a través del uso de un modelo neurotóxico y condiciones de implante más controlados. Por lo tanto, bajo nuestra perspectiva, el presente estudio representa la base para comenzar estudios a largo plazo que prueben la terapia de reemplazo en el modelo retrógrado de degeneración nigrostriatal en un modelo de la EP. Debido a esto, es necesario demostrar, mediante la determinación de los metabolitos DAérgicos y la expresión de marcadores DAérgicos más específicos, que estas células pueden también reconstituir la función neuronal de la SNpc a largo plazo.

12. Referencias

Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; (12):366-75.

Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 1990; (85):119-46.

Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut*. 2007; (4):489-96.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2(4):287-93.

Avetisyan M, Schill EM, Heuckeroth RO. Building a second brain in the bowel. *J Clin Invest.* 2015; (125):899–907.

Azan G, Low WC, Wendelschafer-Crabb G, Ikramuddin S, Kennedy WR. Evidence for neural progenitor cells in the human adult enteric nervous system. *Cell Tissue Res.* 2011; (344):217-225.

Baba Y, Higuchi MA, Abe H, Fukuyama K, Onozawa R, Uehara Y, Inoue T, Yamada T. Anti-cholinergics for axial symptoms in Parkinson's disease after subthalamic stimulation. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012, 4(10):1308-11.

Becker S. Neurogenesis and pattern separation: time for a divorce. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci.* 2017; 8(3):1-15.

Belkind-Gerson J, Carreon-Rodríguez A, Benedict LA, Steiger C, Pieretti A, Nagy N, Dietrich J, Goldstein AM. Nestin-expressing cells in the gut give rise to enteric neurons and glial cells. *Neurogastroenterol Motil.* 2013; (25):61-69.

Bergmann O, Spalding KL, Frisén J. Adult neurogenesis in humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; (7):1-12.

Blesa, J, Przedborski, S. Parkinson's disease: animals models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat.* 2014; (15):8-155

Blum D, Torch S, Lamberg N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 2001; 65:135-172.

Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, Von der Behrens W, Kempermann G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24(3):603-13.

Brederlau A, Correia AS, Anisimov SV, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells.* 2006; 24(6):1433-1440.

Burns AJ, Le Douarin NM. Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat Rec.* 2001; 1;262 (1):16-28.

Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int. J Mol Sci.* 2017; 4;18(3).

Carlsson T, Carta M, Winkler C, Björklund A and Kirik D. Serotonin neuron transplants exacerbate L-DOPA-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2007; (27): 8011–8022.

Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci.* 2002; (3):574-579.

Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; (90):9576-80.

Chang YL, Chen SJ, Kao CL, et al. Docosahexaenoic acid promotes dopaminergic differentiation in induced pluripotent stem cells and inhibits teratoma formation in rats with Parkinson-like pathology. *Cell Transplant.* 2012; 21(1):313-332.

Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat.* 2001; (21):277-288.

Cheon SM, Chan L, Chan DK, Kim JW. Genetics of Parkinson's disease-a clinical perspective. *J Mov Disord.* 2012; (5):33-41.

Cho MS, Lee YE, Kim JY, Chung S, Cho YH, Kim DS, Kang SM, Lee H, Kim MH, Kim JH, Leem JW, Oh SK, Choi YM, Hwang DY, Chang JW, Kim DW. Highly efficient and large scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; (105): 3392-3397.

Cooper O, Hargus G, Deleidi M, Blak A, Osborn T, Marlow E, Lee K, Levy A, Perez-Torres E, Yow A, Isacson O. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral

midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Molecular and cellular neurosciences. Mol Cell Neurosci.* 2010; 45(3):258–266.

Crispo JA, Willis AW, Thibault DP, Fortin Y, Hays HD, McNair DS, Bjerre LM, Kohen DE, Perez-Lloret S, Mattison DR, Krewski D. Associations between Anticholinergic Burden and Adverse Health Outcomes in Parkinson Disease. *PLoS One.* 2016; 3;11 (3):e0150621.

Daadi MM, Grueter BA, Malenka RC, Redmond DE Jr, Steinberg GK. Dopaminergic neurons from midbrain-specified human embryonic stem cell-derived neural stem cells engrafted in a monkey model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2012; 7 (7):e41120.

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain.* 1999; 122 (8):1437-48.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.

Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol.* 2005; 31;168(3):415-27.

De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Baldereschi. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic diseases in the elderly research group. Neurol.* 2000; 54:S21-3.

DeLong MR. Primate Models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 1990; (13):281-5.

Eisch AJ, Cameron HA, Encinas JM, Meltzer LA, Ming GL, Overstreet-Wadiche LS. Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J Neurosci.* 2008; 12;28 (46):11785-91.

Espinoza S, Manago F, Leo D, Sotnikova TD, Gainetdinov RR. Role of catechol-O-methyltransferase (COMT)-dependent processes in Parkinson's disease and L-DOPA treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012, 11(3):251-63.

Fahn S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Mov Disord.* 2015; 30(1):4-18.

Ferreira JJ, Katzenschlager R, Bloem BR, Bonuccelli U, Burn D, Deuschl G, et al. Summary of the recommendations of the EFNS/MDS-ES review on therapeutic management of Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2013; 20(1):5-15.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 23(3):373-82.

Fjodorova M, Torres EM, Dunnett SB. Transplantation site influences the phenotypic differentiation of dopamine neurons in ventral mesencephalic grafts in Parkinsonian rats. *Exp Neurol.* 2017;(291) :8-19.

Freund TF, Powell JF, Smith AD. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.* 1984;13 (4):1189-215.

Fricker RA, Kuiper JH, Gates MA. Transplanting intact donor tissue enhances dopamine cell survival and the predictability of motor improvements in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47169.

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003; 15; 23 (28):9357-66.

Galán L, Gómez-Pinedo U, Guerrero A, Garcia-Verdugo JM, Matías-Guiu J. Amyotrophic lateral sclerosis modifies progenitor neural proliferation in adult classic neurogenic brain niches. *BMC Neurol.* 2017; 6;17(1):173.

Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neuro physiol.* 2008; (119): 1459-1474.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999; (286):548-52.

Grealish S, Diguët E, Kirkeby A, Mattsson B, Heuer A, Bramoulle Y, Van Camp N, Perrier AL, Hantraye P, Björklund A, Parmar M. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell.* 2014; 15(5):653-65

Guo-li M. and Hongjun S. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron.* 2011; 26;70 (4): 687-702.

Habela CW, Yoon KJ, Kim NS, Taga A, Bell K, Bergles DE, Maragakis NJ, Ming GL, Song H. Persistent *Cyfp1* Expression Is Required to Maintain the Adult Subventricular Zone Neurogenic Niche. *J Neurosci.* 2020; 40(10):2015-2024.

Hagell P, Piccini P, Björklund A, Brundin P, Rehnström S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2002; (5): 627-628.

Hagl CI, Heumüller-Klug S, Wink E, Wessel L, Schäfer KH. The human gastrointestinal tract, a potential autologous neural stem cell source. *PLoS One.* 2013; 4;8(9):e72948.

Hallett M. Parkinson's disease tremor: pathophysiology. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012; (1):S85-6.

Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2010; (16): 79–84.

Hayashi K, Surani MA. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(6):493-8.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003; (102):3483-3493.

Homem CC, Repic M, Knoblich JA. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16(11):647-59.

Hornikiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev.* 1966; 18(2):925-64.

Hotta R, Stamp LA, Foong JP, McConnell SN, Bergner AJ, Anderson RB, Enomoto H, Newgreen DF, Obermayr F, Furness JB, Young HM. Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon *J Clin Invest.* 2013; 123(3):1182-91.

Hynes M1, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron.* 1995; 15(1):35–44.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; (418):41-49.

Joseph NM, He S, Quintana E, Kim YG, Núñez G, Morrison SJ. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin Invest.* 2011; (9):3398-3411.

Kaakkola S. Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs.* 2000; 59(6):1233-50.

Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao , Lucassen PJ, Frisén J. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*. 2018; 5;23 (1):25-30.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*. 2004; (27):447-452.

Kempermann G, Song H, and Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2015; 7:a018812.

Kennea NL, Mehmet H. Neural stem cells. *J Pathol*. 2002; 197(4):536-50.

Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, Nelander J, Wood J, Lundblad M, Lindvall O, Parmar M. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep*. 2012; 1(6):703-14.

Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*. 2013; (136): 2419-2431.

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*. 2003; 22;467(4):455-63.

Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002; (35):657-669.

Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1973; (30): 31-48.

LeWitt PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mov Disord*. 2015; 30(1):64-72.

Müller T, Möhr JD. Pharmacokinetics of monoamine oxidase B inhibitors in Parkinson's disease: current status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019; 15(5):429-435.

Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016; 2;8(5).pii: a018820.

Liu MT, Kuan YH, Wang J, Hen R, Gershon MD. 5-HT4 receptor mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci*. 2009; (29):9683-9699.

Ma Y, Tang C, Chaly T, Greene P, Breeze R, Fahn S, Freed C, Dhawan V, Eidelberg D. Dopamine cell implantation in Parkinson's disease: long-term clinical and (18) F-FDOPA PET outcomes. *J Nucl Med*. 2010; (51):7-15.

Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: Basic principles, new concepts and clinical relevance. *Arch Med Res*. 2003; (34):3-15.

Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, et al. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10(5):377-93.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; (4):687-702.

Montiel-Eulefi Enrique and F. Montiel Juan. Origen y migración de células troncales, *Int. J. Morphol*. 2012; 30(4):1332-1337.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; (132):598-611.

Mu X, He G, Cheng Y, Li X, Xu B and Du G. Baicalein exerts neuro protective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in-vivo and in-vitro. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2009; (92): 642-648.

Nagy N, Goldstein AM. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; (66):94-106.

Navarro QE, Navarro QR, España PP, Ahmad M, Díaz PA, Villarreal JL, Vásquez L, Torres A. Neurogénesis en cerebro adulto. *Salud Uninorte*. 2018; 34 (1): 144-159.

Nemoto C, Hida T, Arai R. Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study. *Brain Res*. 1999; (846):129-136.

Obeso JA, Rodríguez MC, DeLong MR. Basal ganglia pathophysiology. A critical review. *Adv Neurol*. 1997; (74):3-18.

Obeso, J.A, Olanow CW, Nutt J.G. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2000; 23(10 Suppl):S2-7.

Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, Mizuhara E, Minaki Y, Kumai M, Hamaguchi A, Nishimura M, Inoue Y, Hayashi H, Takahashi J, Imai T. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development*. 2007; 134(17):3213–3225.

Pallotto M, Deprez F. Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Front Cell Neurosci.* 2014; (20):166.

Parish, CL and Arenas E. Stem-cell-based strategies for the treatment of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis.* 2007 (4): 339–347.

Parra-Cid C, García-López J, García E, Ibarra C. An enteric nervous system progenitor cell implant promotes a behavioral and neurochemical improvement in rats with a 6-OHDA-induced lesion. *Neurotoxicol Teratol.* 2014; (43):45-50.

Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3^o ed. Academic Press 35.

Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R, Oertel W, Quinn N, Samuel M, Rehncrona S, Widner H, Brooks DJ. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol.* 2000; 48 (5):689-95.

Pogarell O, Koch W, Gildehaus FJ, Kupsch A, Lindvall O, Oertel WH, Tatsch K. Long-term assessment of striatal dopamine transporters in Parkinsonian patients with intrastriatal embryonic mesencephalic grafts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2006; 33 (4):407-11.

Politis M, Wu K, Loane C, Quinn NP, Brooks DJ, Rehncrona S, Bjorklund A, Lindvall O, Piccini P. Serotonergic neurons mediate dyskinesia side effects in Parkinson's patients with neural transplants. *Sci Transl Med.* 2010; 2:38ra46.

Pringsheim T, Jette N, Frolkis A and Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 2014; (29):1583–1590.

Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience.* 1995; (67):631-647.

Qi Z, Miller GW, Voit EO. Computational systems analysis of dopamine metabolism. *PLoS One.* 2008; 18;3(6):1-10.

Ramirez MT, Castillo GC, Martinez SA, long term behavioral effect of functional dopaminergic neurons generated from human neural stem cells in the rat 6-OHDA Parkinson's disease model. Effect of the forced expression of BCL-XL. 2012; (232):225-232.

Riederer P, Laux G. MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol.* 2011, 20(1):1-17.

Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; 12; 363(1489):123-37.

Rodrigues FB, Ferreira JJ. Opicapone for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2017; 18(4):445-453.

Rodríguez VM, Villar VA, Valencia RC, Cervantes AA. Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Arch Neurocién.* 2011; 16(2): 64-68.

Rodriguez-Orozco MC, Obeso JA, Lang AE, Houeto JL, Pollak P, Rehnrona S, Kulisevsky J, et al . Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain.* 2005; 128 (Pt 10):2222-3.

Romero-Trujillo JO, Frank-Márquez N, Cervantes-Bustamante R, Cadena-León JF, Montijo-Barrios E, Zárate-Mondragón F, Cázares-Méndez JM, Ramírez-Mayans J. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediatr Mex.* 2012; 33(4):207-214.

Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by co culture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med.* 2006; (12):1259-1268.

Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kinumi T, Yoshida Y, Masuo Y, Niki E. Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action. *Free Radic Biol Med.* 2007; (5):675-85.

Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000; (164):247-256.

Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience.* 1994; (59):401-415.

Schafer KH, Van Ginneken C, Copray S. Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. *Anat Rec.* 2009; (292):1940-1952.

Schapira AH. Recent developments in biomarkers in Parkinson disease. *Curr Opin Neurol.* 2013; 26(4):395-400.

Schober A, Classic toxin-induced animal models of Parkinson´s disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004; (318): 215-224.

Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol.* 2004; (22):1115-1124.

Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus *J Neurosci*. 2001; 15;21(18):7153-60.

Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*. 2004; 1;46 (1):41-52.

Suárez-Rodríguez R, Belkind-Gerson J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex vivo into neurons, glia, and smooth muscle. *Stem Cells*. 2004; (22):1373-1385.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; (131):861-72.

Tambasco N, Simoni S, Marsili E, Sacchini E, Murasecco D, Cardaioli G, Rossi A, Calabresi P. Clinical aspects and management of levodopa-induced dyskinesia. *Parkinsons Dis*. 2012; 2012:745947.

Tran T, Brophy JM, Suissa S, Renoux C. Risks of Cardiac Valve. Regurgitation and Heart Failure Associated with Ergot- and Non-Ergot-Derived Dopamine Agonist Use in Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review of Observational Studies. *CNS drugs*. 2015; 29(12):985-98.

Tsuboi K, Kimber TA, Shults CW. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res*. 2000; (866):55-64.

Ulloa F, Briscoe J. Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle*. 2007; (21):2640-9.

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

Vaillancourt DE, Lehericy S. Illuminating basal ganglia and beyond in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2018; 33(9):1373-1375.

Wakeman DR, Hiller BM, Marmion DJ, McMahon CW, Corbett GT, et al. Cryopreservation maintains functionality of human iPSC dopaminergic neurons and rescues Parkinsonian phenotypes in vivo. *Stem Cells Reports*. 2017; (9):149-161.

Weintraub D, Comella CL, Horn S. Parkinson's disease Part 1. Pathophysiology, symptoms, burden and assessment. *Am J Manag Care*. 2008; (14):S40-8. .

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:387-403.

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; (105): 5856-5861.

Willis AW. Parkinson disease in the elderly adult. *Mo Med.* 2013; 110(5):406-10.

Winkler C, Kirik D, and Bjorklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci.* 2005; (28): 86–92.

Xi J, Liu Y, Liu H, Chen H, Emborg ME, Zhang SC. Specification of midbrain dopamine neurons from primate pluripotent stem cells. *Stem cells.* 2012; 30(8):1655–1663.

Yntema G, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol.* 1954; (101):515-41.

Young HM, Bergner AJ, Muller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol.* 2003; (456):1-11.

Young HM, Hearn CJ, Newgreen DF. Embryology and development of the enteric nervous system. *Gut.* 2000; 47(4):iv12-4.

Yun JY, Kim HJ, Lee JY, Kim YE, Kim JS, Kim JM, Jeon BS. Comparison of once-daily versus twice-daily combination of Ropinirole prolonged release in Parkinson's disease. *BMC Neurol.* 2013; 2(13):1-7.

Zhang RL, Zhang L, Zhang ZG, Morris D, Jiang Q, Wang L, Zhang LJ, Chopp M. Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum. *Neuroscience.* 2003; (116):373-382.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlén M, Cassidy RM, Johansson CB, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; (100): 7925-30.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; (13):4279-4295.

Anexo

RESEARCH ARTICLE



Early Expression of Neuronal Dopaminergic Markers in a Parkinson's Disease Model in Rats Implanted with Enteric Stem Cells (ENSCs)



Carmen Parra-Cid^{1,2,*}, Eduardo Orozco-Castillo^{1,3}, Julieta García-López¹, Elena Contreras-Figueroa¹, Laura E. Ramos-Languren⁴, Clemente Ibarra¹, Alfonso Carreón-Rodríguez⁵, Michael Aschner⁶, Mina Königsberg⁷ and Abel Santamaría^{8,7}

¹Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico; ²Programa de Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico; ³Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ⁴Coordinación de Psicología y Neurociencias, División de Estudios Profesionales, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ⁵Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública, Mexico City, Mexico; ⁶Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, United States; ⁷Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico; ⁸Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

Abstract: *Background:* Parkinson's Disease (PD) is a common neurodegenerative disorder affecting the dopaminergic (DAergic) system. Replacement therapy is a promising alternative aimed at reconstructing the cytoarchitecture of affected brain regions in PD. Experimental approaches, such as the replacement of DAergic neurons with cells obtained from the Enteric Nervous System (ENS) has yet to be explored.

Objective: To establish and characterize a cell replacement strategy with ENS Cells (ENSCs) in a PD model in rats.

Methods: Since ENSCs can develop mature DAergic phenotypes, here we cultured undifferentiated cells from the myenteric plexus of newborn rats, establishing that they exhibit multipotential characteristics. These cells were characterized and further implanted in the *Substantia nigra* pars compacta (SNpc) of adult rats previously lesioned by a retrograde degenerative model produced by intrastriatal injection of 6-Hydroxydopamine (6-OHDA). DAergic markers were assessed in implants to validate their viability and possible differentiation once implanted.

Results: Cell cultures were viable, exhibited stem cell features and remained partially undifferentiated until the time of implant. The retrograde lesion induced by 6-OHDA produced DAergic denervation, reducing the number of fibers and cells in the SNpc. Implantation of ENSCs in the SNpc of 6-OHDA-lesioned rats was tracked after 5 and 10 days post-implant. During that time, the implant increased selective neuronal and DAergic markers, including Microtubule-Associated Protein 2 (MAP-2), Dopamine Transporter (DAT), and Tyrosine Hydroxylase (TH).

Conclusion: Our novel results suggest that ENSCs possess a differentiating, proliferative and restorative potential that may offer therapeutic modalities to attenuate neurodegenerative events with the inherent demise of DAergic neurons.

ARTICLE HISTORY

Received: December 28, 2019
Revised: March 16, 2020
Accepted: April 03, 2020

DOI:
10.2174/157315271966620041712948



Keywords: Replacement therapy, stem cells, 6-hydroxydopamine, enteric nervous system, Parkinson's disease, dopaminergic markers.

*Address correspondence to these authors at the Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Av. Insurgentes Sur 3877; Mexico City 14269, Mexico; Tel: (+5255)5606-3822; E-mail: aboada@yahoo.com; and Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Mexico City, Mexico; E-mail: carmelapcid@yahoo.com.mx

1. INTRODUCTION

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disorder with well-known neurochemical alterations and neuropathological features. PD is considered the second most frequently expressed chronic neurodegenerative disorder worldwide [1,

