

Estudio morfológico comparativo del trasplante dopaminérgico en diferentes ganglios basales

Lisis Gabriela Martínez Martí¹, Nancy Pavón Fuentes², Lisette Blanco Lezcano³, Raúl Macías González⁴, Lázara Castillo Díaz⁵, Juan Carlos Rosillo Martí⁶, Yosvany Coro Grave de Peralta⁶

RESUMEN

Estudio morfológico comparativo del trasplante dopaminérgico en diferentes ganglios basales el implante de un injerto de estructura dopaminérgicas en ganglios basales es uno de los tratamientos del Parkinson. en este trabajo se presentan los resultados de este implante en el estriado los núcleos subtalámicos y en la sustancia negra, el estudio se efectuó en ratas wistar divididas en tres grupos. Se encontró que las células entranigradas e intrasubtalámicas a diferencia de las intraestructurales se difundían hacia varias áreas cercanas siendo el mayor crecimiento en los implantes en los núcleos subtalámicos y al parecer de caudado putamen ofrece el mejor medio para la sobrevivencia de las células dopaminérgicas.

Palabras clave: Parkinson, núcleos subtalámicos, estriado, trasplante dopaminérgico.

A COMPARATIVE MORPHOLOGICAL STUDY OF DOPAMINERGIC GRAFTS AMONG DIFFERENT BASAL GLANGLIA

ABSTRACT

Fetal mesencephalic graft into dopaminergic denervated structures is one of the restorative strategies used in the treatment of Parkinson's disease. In the present study, we compared the morphological features of dopaminergic grafts into the striatum, the subthalamic nucleus and substantia nigra pars reticulata. Materials and methods: wistar rats with unilateral 6-hydroxy-

dopamine lesions of the substantia nigra pars compacta were divided into three groups and received injections of 300 000 embryonic rat ventral mesencephalic cells in the striatum, substantia nigra pars reticulata, or subthalamic nucleus. Graft survival was assessed using tyrosine hydroxylase immunohistochemistry, 4 months after transplantation. Results. Intranigrally and intrasubthalamically grafted cells, unlike intrastriatally grafted ones, spread toward several surrounding areas. The dispersion of dopaminergic neurons was greater in the ones implanted into the subthalamic nucleus. In the three cases, TH-immunoreactive cells tended to cluster in the periphery of the grafts, with fewer cells observed in its center. A network of TH-positive fibers was observed within the graft itself and also extended into the host in all directions. Dopaminergic neurons grafted in the striatum showed more developed neuritic processes and larger cell bodies. Besides, we have found that the graft volume and TH-positive cell number were greater in the intrastriatal grafts than in the intrasubthalamic or intranigral grafts. Conclusion: our results evidenced a greater survival and neuronal size

Recibido: 3 abril 2006 Aceptado: 21 abril 2006

¹Departamento de Neurobiología. ²Departamento de Inmunología. ³Departamento de Neurofisiología Experimental.

⁴Subdirección de Ciencia y Tecnología. ⁵Departamento de Neurobiología. ⁶Departamento de Neurofisiología Experimental.

Correspondencia: Lisis G. Martínez Martí. Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). Dirección: Ave. 25 # 15805 entre 158 y 160. Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: lisis@neuro.ciren.cu

of transplanted dopaminergic neurons intrastriatally than those transplanted into substantia nigra pars reticulata or the subthalamus and suggest that the caudate-putamen offers a more favorable cellular environment for the survival of dopaminergic cells than other tested structures.

Key word: Parkinson, nucleus subtalamic, estriate, transplant survival.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo, caracterizado fundamentalmente por la pérdida de la dopamina estriatal, secundaria a la degeneración progresiva de las células dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc). Una de las estrategias terapéuticas fundamentales en el tratamiento de la enfermedad, consiste en la restauración de la inervación dopaminérgica mediante el trasplante del tejido fetal en las estructuras denervadas. El cuerpo estriado formado por el núcleo caudado-putamen (CP) constituye la estructura blanca por excelencia para el implante de células dopaminérgicas fetales y consecuentemente ha sido el más evaluado. La mayoría de los reportes de trasplante han obtenido supervivencia neuronal en este núcleo; lográndose disminuir e incluso revertir la asimetría motora presente en las ratas hemiparkinsonianas¹. Sin embargo, se conoce que al degenerar las neuronas de la SNpc, no sólo se altera la inervación a la unidad caudado-putamen sino también la llegada de dopamina a otros núcleos de los ganglios basales como son: la parte reticulada de la sustancia negra (SNpr), el globo pálido y el núcleo subtalámico (NST), por lo que estos núcleos también constituyen sitios estratégicos para el trasplante de las neuronas dopaminérgicas²⁻⁴.

Existen un conjunto de factores que intervienen en la supervivencia e interacción de las células transplantadas y el tejido hospedero entre los que se encuentran: el sitio blanco de trasplante, disponibilidad de factores tróficos, elementos vasculares y gliales, neuroplasticidad intrínseca de las neuronas de estos núcleos, entre otros. Ha sido reportado que el sitio blanco de implante interviene en la supervivencia de las células dopaminérgicas transplantadas^{4,5} y en el crecimiento de las fibras eferentes provenientes de las mismas^{6,7,8}. El efecto funcional del trasplante en pacientes con la enfermedad de Parkinson y en modelos experimentales de la enfermedad ha sido extensamente evaluado⁹⁻¹¹. Sin embargo, existen pocos reportes que realizan un análisis morfológico comparativo del comportamiento del trasplante de las células mesen-

cefálicas fetales en CP y otros núcleos de los ganglios basales, lo que resulta importante en el análisis de la reinervación dopaminérgica a núcleos extraestriatales. En el presente trabajo utilizando la técnica del micro-trasplante en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas, se evaluó la supervivencia y desarrollo morfológico de las neuronas mesencéfalicas fetales positivas para la tiroxina hidroxilasa (TH) en tres sitios de implante: CP, NST y SNpr, con el objetivo de conocer la influencia del entorno neuronal estriatal y extraestriatal sobre estos parámetros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental: se utilizaron en el experimento ratas machos Wistar 200 a 250 g de peso procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). A todos los animales se les realizó una lesión unilateral de la SNpc con 6-OH dopamina. Pasado un mes, las ratas con criterio conductual de lesión fueron divididas en cuatro grupos experimentales: grupo a trasplantar en el CP, grupo a trasplantar en la SNpr, grupo a trasplantar en el NST y grupo control de la lesión. Trascorridos 4 meses del trasplante los animales fueron sacrificados para la realización del estudio morfológico. Durante el transcurso del experimento las ratas se mantuvieron en el bioterio del centro en cajas plásticas translúcidas (6 animales por caja antes del trasplante y 3 animales por caja después del trasplante), a una temperatura media de 23°C con agua y alimentación suministrada *ad libitum* y régimen de luz y oscuridad de 12 horas.

Lesión con 6-OH dopamina: las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (420 mg/kg de peso, I.P) y se colocaron en el sistema estereotáxico (David Kopf Instruments, Estados Unidos de Norteamérica). Se lesionó la SNpc derecha por inyección estereotáctica con la neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA-HCL (Sigma, USA) (8 µg/3µL de solución salina y 0.2 mg/mL de ácido ascórbico). Se utilizaron las coordenadas siguientes: AP: -4.4 mm, L:+1.2 mm y V: -7.8 mm de la duramadre, barra incisiva, 2.4 mm por debajo de la línea interaural)¹².

Actividad rotatoria: pasado un mes de la lesión quirúrgica se analizó la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5 mg/kg de peso, I.P) y por apomorfina (0.05 mg/kg de peso, S.C). El número de vueltas completas (360°) realizadas por el animal 5 minutos después de inyectado el agonista dopaminérgico fue registrado en un rotómetro electrónico (ROTORCID, ICID, Cuba). Se seleccionaron las ratas que exhibieron

en su conducta rotatoria al menos 630 vueltas completas ipsilaterales a la lesión, en 90 min, después de la inyección con D-anfetamina y 150 vueltas completas o más, contralaterales al hemisferio lesionado, en 45 minutos, después de la inyección con apomorfina.

Microtrasplante de células fetales dopamínergicas: las suspensiones celulares fueron obtenidas de embriones de ratas Wistar (E14-E15) y se prepararon siguiendo la técnica modificada por Nikkhah, et al¹³. Las suspensiones fueron inyectadas mediante una cánula de vidrio de diámetro externo entre 70 y 90 μm , acoplada a la aguja de una jeringa Hamilton de 5 μL . La concentración celular fue de 1.5×10^5 células para el grupo de trasplante en el CP y de 3×10^5 células para los grupos de trasplante en el NST y en la SNpr. Se colocaron 0.25 μL de la suspensión celular en cada depósito realizado y un total de 2 μL en el cuerpo estriado y 1 μL en los casos del NST y de la SNpr (tabla 1).

Tabla 1.

| Estructura trasplantada | n | Coordenadas | | | | Volumen total (?L) | Número total de células |
|-----------------------------------|---|-------------|-------|-------|------|-----------------------|-------------------------------|
| | | AP | L | V1 | V2 | | |
| Caudado-putamen | 8 | +1.70 | +2.20 | -4.00 | - | 2.0 | 300 000 |
| | | | | | 5.50 | | |
| | | +1.10 | +2.40 | -4.00 | - | | |
| | | | | | 5.00 | | |
| | | +0.48 | +3.00 | -4.00 | - | | |
| Sustancia negra par reticulada | 4 | -0.30 | +3.40 | -4.50 | - | 1.0 | 300 000 |
| | | | | | 5.40 | | |
| | | -0.80 | +4.00 | -5.00 | - | | |
| | | | | | | | |
| | | -5.30 | +2.40 | -8.20 | - | | |
| Núcleo subtalámico | 1 | -5.80 | +2.0 | -8.30 | - | 1.0 | 300 000 |
| | | | | | 8.00 | | |
| | | -3.80 | +2.30 | -8.00 | - | | |
| subtalámico | 1 | | | | 8.20 | | |
| | | | | | | | |

n, número de animales en cada grupo.

Estudio morfológico

Cuatro meses después del trasplante, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (420 mg/kg, I.P) y sacrificados para la realización del estudio morfológico. La fijación de las muestras se llevó a cabo por el método de perfusión aórtica, se pasaron por cada rata 250 mL de solución salina y luego 300 mL de solución fijadora (paraformaldehido al 4

% en amortiguador de fosfato [PB] al 0.1 mol/L, pH 7.3). Los cerebros fueron extraídos y posfijados en la misma solución fijadora durante 3 hs. Después, las muestras se deshidrataron en soluciones de sacarosa al 7, 15 y 30% durante 12 hs en cada caso y seguidamente fueron congeladas y almacenadas a -70°C. Se realizaron cortes coronales a un grosor de 20 μm y además sagitales en el caso del grupo control de la lesión, en un crióstato digital 1 720 (Leitz, Alemania). Las secciones se recogieron mediante un muestreo sistemático y al azar, en láminas gelatinizadas y se almacenaron a -20 °C, hasta su uso posterior.

Inmunohistoquímica: las muestras fueron descongeladas y lavadas (PB 0.1M). Posteriormente, se incubaron en una solución de bloqueo durante 20 min (PB 0.1 M, suero fetal de ternera al 20% y tritón al 0.25%). El anticuerpo primario monoclonal anti-TH (1/100, Boehringer Mannheim), el anticuerpo secundario biotinilado anti-Ig de ratón, (1/500, Boehringer Mannheim) y el complejo ABC peroxidasa (1/100, DAKO), fueron diluidos con PB que contenía suero fetal de ternera al 1 y 0.125% de tritón X-100). Para el anticuerpo primario la incubación fue durante toda la noche y para el anticuerpo secundario y el complejo ABC peroxidasa durante una hora. Posterior a cada una de estas incubaciones se efectuaron 3 lavados en PB de 5 min cada uno. Para el revelado se utilizó 3,3 diaminobenzidina al 0.05% y H₂O₂ al 0.01%. Seguidamente las secciones fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, aclaradas en xilol y montadas con DPX.

Morfometría: la estimación de los parámetros morfométricos se efectuó a partir de cortes coronales escogidos al azar y sistemáticamente en las láminas. El cálculo del volumen total se realizó según el principio de Cavalieri¹⁴ y con la ayuda del sistema automatizado de imágenes Digipat (Ecisoft, Cuba). La estimación de la densidad neuronal y el número total de neuronas fue corregida según la fórmula Abercrombie¹⁵, realizándose el conteo de células positivas para la TH al microscopio óptico de campo brillante. Se seleccionaron 200 neuronas positivas para la TH, que cumplieron con la condición de que se observara el núcleo y al menos dos neuritas primarias y en ellas se midió el diámetro neuronal.

Pruebas estadísticas: se realizó un análisis descriptivo de los datos y los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media para cada una de las variables evaluadas. Para las comparaciones entre grupos se aplicó una prueba U de Mann-Whitney para las variables volumen total, densidad neuronal y número total, mientras que para la

comparación del diámetro medio se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido por una prueba de rangos múltiples de Duncan. En todos los casos el nivel de significación tomado fue de $p < 0.05$. La utilización de 200 neuronas para la medición del diámetro medio aseguró que el coeficiente del error para esta variable fuera menor que el 5%.

RESULTADOS

Lesión con 6-OH dopamina

En el grupo control de la lesión se constató que la inyección estereotáctica de 6-OH dopamina en la SNpc hubiera producido pérdida completa de las neuronas dopaminérgicas de la SN y del área tegmental ventral (figura 1). De igual forma no se observaron fibras inmunorreactivas a la TH en la banda medial del cerebro anterior, en la cápsula interna y en el estriado ipsilateral a la lesión.

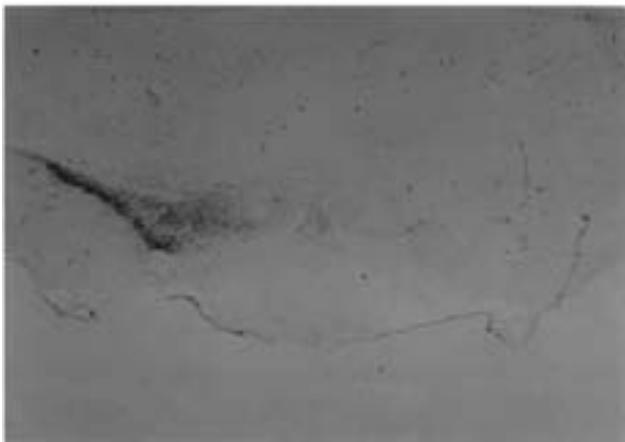


Figura 1. Corte coronal del mesencéfalo ventral donde se demuestra la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra par compacta y en el área tegmental ventral, 40X.

TRASPLANTE

Localización de los trasplantes

La observación de los trayectos seguidos por la cánula del implante en los animales nos permite asegurar que en ninguno de los casos analizados el depósito de las células se realizó fuera de la estructura blanca. Sin embargo, al analizar la localización de las células dopaminérgicas transplantadas encontramos que para el núcleo CP el 78 % del total de las mismas se ubicó en dicha estructura (figura 2A), encontrándose las restantes en áreas de la corteza cingulada anterior y el cuerpo calloso. En el caso del trasplante en la

SNpr el 71 % de las células se situaron sobre esta estructura (figura 2B), mientras que las restantes se hallaron fundamentalmente en la SNpc, el pedúnculo cerebral y la cápsula interna. Las células transplantadas en el NST fueron las que mostraron un mayor grado de dispersión, además de ubicarse en este núcleo, alcanzaron otras localizaciones como el n úcleo entopeduncular, la cápsula interna, la zona incerta y el área hipotalámica lateral (figura 2C).

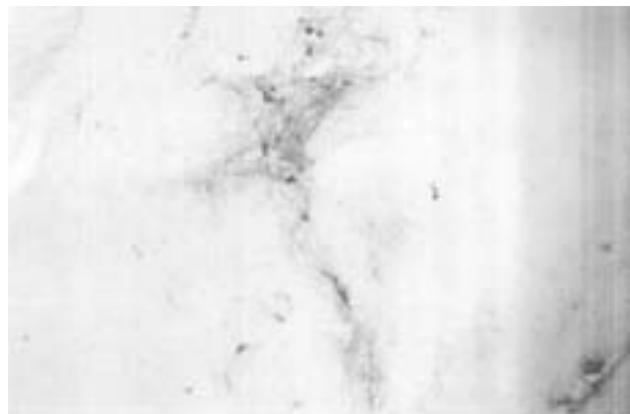


Figura 2. Trasplante de células dopaminérgicas inmunoreactivas al anticuerpo contra la tiroxina hidroxilasa, en el cuerpo estriado (A), en el n úcleo subtalámico (B) y en la sustancia negra par reticulada (C), 40x.

En las tres estructuras blanco, el trasplante de las neuronas positivas para la TH se observó de manera continua en el eje anteroposterior y la extensión promedio del mismo en dicho eje fue mayor que la distancia entre la primera y la última coordenada del implante. Los trasplantes ubicados en el cuerpo estriado mostraron una extensión anteroposterior promedio de 3.4 mm para una distancia de 2.5 mm entre la primera y la última coordenada del implante. El trasplante intranigral se extendió 1.8 mm, para una distancia de 1.00 mm entre la primera y la última coordenada AP. Mientras, el trasplante en el NST alcanzó una extensión de 2.25 mm en el eje anteroposterior (desde la coordenada AP:- 2.8 mm con respecto a bregma hasta alcanzar la SN en algunos casos).

Disposición y tamaño de las neuronas positivas para la TH

En los tres grupos de ratas con implantes en diferentes núcleos de los ganglios basales las neuronas TH-positivas mostraron un patrón de distribución celular similar. Las mismas se dispusieron principalmente en la periferia del trasplante formando grupos celulares, mientras que en la región central se observaron

pocos cuerpos neuronales. Una intensa red de fibras inmunorreactivas a la TH se observó hacia el interior del trasplante y alrededor del mismo, penetrando en el tejido hospedero, con un mayor desarrollo neurítico en el caso del trasplante intraestriatal al compararse con los otros dos sitios blancos. Las neuronas dopaminérgicas transplantadas en la SNpr y en el NST mostraron un menor diámetro medio que las transplantadas en el núcleo CP (tabla 2).

Tabla 2. Resultados morfométricos. Cada valor representa la media ± error estándar de las medias. * Trasplante estriatal versus trasplante en NST, § trasplante estriatal versus trasplante en la SNpr. Las variables volumen total, densidad neuronal y número total de neuronas positivas para la TH se compararon utilizando una prueba U de Mann-Whitney, $p<0.05$ y para la variable diámetro neuronal se utilizó un ANOVA paramétrico seguido por una prueba de rangos múltiples de DUNCAN, $p<0.05$. NST, núcleo subtalámico; CP, caudado putamen; SNpr, sustancia negra par reticulada.

| Estructura | Volumen total (mm ³) | Densidad neuronal (células TH-positivas /mm ³) | Número total de neuronas TH-positivas. | Diámetro neuronal |
|------------|----------------------------------|--|--|-------------------|
| CP | 2.32±0.41* | 938±142* | 2332±608* | 17.14±0.21* |
| SNpr | 0.65±0.14 | 753±149 | 554±208 | 12.18±0.28 |
| NST | 1.01±0.10 | 472±54 | 487±79 | 12.68±0.22 |



Figura 3. Vista ampliada de las neuronas dopaminérgicas transplantadas en el cuerpo estriado (A), núcleo subtalámico (B) y la sustancia negra par reticulada (C), 100x.

Volumen del trasplante y número de neuronas TH-positivas

A pesar de que el número de células transplantadas en los tres núcleos analizados fue similar, el trasplante en CP mostró el mayor volumen y el mayor número de neuronas TH-positivas (tabla 2). El número de células TH-positivas transplantadas y encontradas en el cuerpo estriado fue entre 4 a 5 veces mayor que el estimado para la SNpr y el NST. Por otra parte, la den-

sidad neuronal fue mayor en el trasplante en CP en relación con el ubicado en NST, no así al compararse con el trasplante en la SNpr.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que el ambiente estriatal favorece la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas transplantadas en ratas hemiparkinsonianas al compararse con el NST y la SNpr. Estos resultados morfológicos concuerdan con los hallazgos conductuales observados por nosotros y previamente reportados^{16,17}, donde el mayor impacto sobre la mejoría en la conducta motora de los animales hemiparkinsonianos se obtuvo con el trasplante intraestriatal.

Diversos reportes señalan que el CP pudiera ofrecer un ambiente favorable para la sobrevivencia y maduración de las neuronas dopaminérgicas. Se ha demostrado que la adición de extracto estriatal o preparaciones de membranas de neuronas estriatales promueven la sobrevivencia de las células del mesencéfalo ventral en cultivo^{18,19}. En este mismo sentido, O'Malley, et al (1991) encontraron que el número de neuronas dopaminérgicas se incrementó 3.5 veces al proporcionarse un contacto directo entre las células del mesencéfalo ventral y una monocapa de soporte derivada del tejido estriatal²⁰. Además, observaron que las células derivadas de la región estriatal y las derivadas del mesencéfalo ventral ejercían un efecto similar sobre la sobrevivencia de las células dopaminérgicas. Sin embargo, nuestros resultados indican que el tejido estriatal y el mesencefálico no favorecen de manera similar la supervivencia del trasplante de neuronas dopaminérgicas. En nuestro caso el número de neuronas TH-positivas intraestriatales fue 4.2 veces mayor que el estimado en la SNpr. Estos resultados coinciden con otros estudios *in vivo* que han demostrado una supervivencia del trasplante dopaminérgico intraestriatal entre 7 a 8 veces mayor al trasplante intranigral^{4,5}. Con respecto al NST podemos decir que las células transplantadas en el mismo y localizadas en este núcleo y áreas aledañas no se diferenciaron por su supervivencia de las localizadas en la SNpr y sus áreas colindantes, mientras que su número total fue menor que el observado en el CP.

En cuanto al desarrollo morfológico neuronal encontramos que las células TH-positivas transplantadas en el CP presentaron un mayor tamaño de sus somas y un mayor desarrollo de sus procesos neuríticos al compararse con las observadas en la SNpr y en el NST. El sitio de implante influye también en el cre-

cimiento y desarrollo de las fibras de las neuronas dopamínergicas transplantadas. Estudios *in vitro* han mostrado que el tejido estriatal ejerce un mayor efecto estimulante sobre el crecimiento neurítico de las células TH-positivas del mesencéfalo, que el efecto que provocan el tejido de hipocampo, corteza y cerebro, órganos estos que no son blanco de estas células^{7,8}. Por otro lado, estudios *in vivo* han evidenciado que el mayor crecimiento de estas fibras ha sido hallado en el caudado-putamen⁶ y en el núcleo *acumbens*²¹, mientras que poco o ningún crecimiento de fibras fue encontrado cuando las células dopamínergicas fueron transplantadas en la corteza²², hipotálamo lateral y SN usando la técnica de trasplante convencional^{23,24}. Sin embargo, utilizando la técnica del microtrasplante en la SN se ha observado sobrevivencia de numerosas neuronas TH-positivas, con abundantes fibras^{4,25}, lo que ha sido descrito también para el trasplante en el NST². En nuestro caso, el trasplante intranigral e intrasubtalámico demostró crecimiento de fibras TH-positivas, aunque no en la misma magnitud que el observado en el trasplante intraestriatal.

El número de células inyectadas por depósito es un factor influyente en la sobrevivencia del trasplante dopamínérigo²⁶. Por lo que es, necesario aclarar que en nuestro caso este factor pudo favorecer la sobrevivencia de células TH-positivas en el núcleo CP (células inyectadas por depósito: CP, 35 500 células /ul y en NST y SNpr, 75 000 células /ul). Según los resultados encontrados por Nikkhah, *et al* (1994) los depósitos celulares entre 50 000 y 75 000 células mejoran la sobrevivencia de las células dopamínergicas con respecto a depósitos de gran tamaño (150 000 o 300 000 células). En este mismo sentido, depósitos aún más pequeños, de 20 000 y 35 000 células logran mayores sobrevivencias por una óptima integración del trasplante y una mínima disrupción del tejido hospedero⁵. Por otra parte, en nuestro caso, el hecho de haber ubicado igual número de células totales en todos los sitios blancos pudo ser un factor que incidiera de manera negativa en la sobrevivencia y crecimiento de las células transplantadas en el NST y en la SNpr, si tenemos en cuenta el menor tamaño de estos núcleos en comparación con el CP. Quizás, el trasplante de un menor número de células en el NST y la SNpr, hubiera circunscrito las células en mayor medida a la estructura blanco y hubiera favorecido la sobrevivencia de las mismas. Bartlett, *et al* (2004) demostraron en el estriado que el trasplante de un menor número de células (50 000) en comparación con un mayor número (400 000) presentó un incremento en la sobrevivencia

neuronal, crecimiento de fibras y producción de dopamina, mientras que redujo el trauma en el tejido hospedero, provocando el mismo efecto funcional en ambos casos²⁷.

En relación a la localización del trasplante podemos plantear que en el caso del cuerpo estriado la presencia de trasplante extraestriatal estuvo restringida a células que quedaron en corteza y cuerpo calloso durante el paso de la cánula. Mientras que para las células dopamínergicas transplantadas en SNpr y NST la mayoría de las células ubicadas en estructuras aledañas se extendían en el eje anteroposterior del cerebro. En nuestro criterio, en estos núcleos a diferencia de lo encontrado en CP este proceso obedece, probablemente, a un fenómeno de migración neuronal, que pudiera estar causado por la relación entre el número de células transplantadas y el tamaño de estos núcleos, por la no disposición en los mismos de suficientes factores tróficos o por la atracción de las células transplantadas hacia ambientes neuronales más favorables. En el caso del NST las células transplantadas alcanzaron una extensión continua en el eje anteroposterior de 2.5 mm, lo que evidencia una importante migración de estas células teniendo en cuenta que fueron ubicadas todas en la misma coordenada AP, lo que concuerda con el hecho de que en este trasplante se encontró el menor valor de densidad neuronal. Estos resultados no concuerdan con los reportados por otros autores que han realizado trasplante en estas estructuras utilizando, incluso, un mayor número de células totales en el mismo y encontrando que los trasplantes han quedado circunscritos a las estructuras en estudio^{2,4}. Nikkhah, *et al* observaron que las neuronas dopamínergicas transplantadas y sus proyecciones se ubicaron casi exclusivamente en la sustancia negra, para un número total de 400 000 y 840 000 células transplantadas⁴. De igual forma se ha reportado que utilizando un total de 900 000 células transplantadas en la sustancia negra y en el NST las células dopamínergicas observadas estuvieron bien circunscritas a estas estructuras². En las discrepancias presentes en estos resultados pudieran estar incidiendo diferencias técnicas en la realización de los implantes por los diferentes grupos de trabajo. En cualquier caso, este mismo grupo de autores ha insistido recientemente en la repercusión del número de células transplantadas sobre la sobrevivencia de las mismas²⁷. En nuestro caso, otro factor que pudo incidir en la menor sobrevivencia de las células TH-positivas transplantadas en NST y SNpr al compararse con el CP consiste en que un número importante de estas células se encontraron ubicadas en las estructuras aledañas

y no en los núcleos blancos. Lo anterior, trajo como consecuencia, quizás, que las células trasplantadas no tuvieran acceso a una cantidad adecuada de factores tróficos derivados de las células blanco, lo cual se conoce que es indispensable para el correcto crecimiento, desarrollo y diferenciación de las células trasplantadas.

REFERENCIAS

1. Brundin P, Barbin G, Strecker RE, Isacson O, Prochiantz A, Björklund A. Survival and function of dissociated rat dopamine neurones grafted at different developmental stages or after being cultured in vitro. *Brain Res* 1988; 467(2): 233-43.
2. Mukhida K, Baker KA, Sadi D, Mendez I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci* 2001; 21(10):3521-30.
3. Bartlett LE, Mendez I. Dopaminergic reinnervation of the globus pallidus by fetal nigral grafts in the rodent model of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 2005;14(2-3):119-27.
4. Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Björklund A. Intranigral fetal dopaminergic grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci* 1994; 14(6):3449-61.
5. Nikkhah G, Cunningham MG, Jödicke A, Knappe U, Björklund A. Improved graft survival and striatal reinnervation using a microtransplantation approach in the rat Parkinson model. *Brain Res* 1994;633:133-43.
6. Doucet G, Brundin P, Descarries L, Björklund A. Effect of prior dopamine denervation on survival and fiber outgrowth from intrastriatal fetal mesencephalic grafts. *Eur J Neurosci* 1990; 2:279-90.
7. Hemmendinger LM, Garber BB, Hoffmann PC, Heller A. Target neuron specific process formation by embryonic mesencephalic dopamine neurons *in vitro*. *PNAS* 1981; 78:1264-8.
8. Ostergaard K, Schou JP, Zimmer J. Rat ventral mesencephalon grown as organotypic slice cultures and co-cultured with striatum, hippocampus, and cerebellum. *Exp Brain Res* 1990;82:547-65.
9. Agrawal AK, Chaturvedi RK, Shukla S, Seth K, Chauhan S, Ahmad A, et al. Restorative potential of dopaminergic grafts in presence of antioxidants in rat model of Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat* 2004;28:253-64.
10. Lindvall O, Hagell P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2000; 127:299-320.
11. Nguyen JP. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. Update and future. *Neurochirurgic* 2004; 50:619-23.
12. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2ed. New York: Academic Press; 1986.
13. Nikkhah G. *Microtransplantation of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease*. From the department of Medical Cell Research. Sweden. Doctoral thesis: 1994.
14. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microscopy* 1987;147:229-63.
15. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94:239-46.
16. Pavón N, Macías González R, Blanco-Lezcano L, Alvarez-González L, Martínez- Martí L, Castillo L, et al. Efecto del trasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en estriado y en el n úcleo subtalámico de ratas hemiparkinsonianas. *Rev Neurol* 2002;34(10):917-23.
17. Blanco L, Pavón N, Macías R, Castillo L, Díaz C, García A, et al. Microtrasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en estriado y *substantia nigra pars reticulata* de ratas hemiparkinsonianas. Estudio conductual. *Rev Neurol* 2000; 30 (12): 1122-7.
18. Carvey PM, Ptak LR, Lo ES, Lin D, Buhrfiend CM, Goetz CG, et al. Levodopa reduces the growth promoting effects of striatal extracts on rostral mesencephalic tegmentum culture. *Exp Neurol* 1991;114:28-34.
19. Prochiantz A, Daguet M, Herbet A, Glowinski J. Specific stimulation of *in vitro* maturation of mesencephalic dopaminergic neurons by striatal membranes. *Nature* 1981; 293:570-2.
20. O'Malley E, Black I, Dreyfus C. Local support cells promote survival of substantia nigra dopaminergic neurons in culture. *Exp Neurol* 1991;112:40-8.
21. Brundin P, Strecker RE, Londos E, Björklund A. Dopamine neurons grafted unilaterally to the nucleus accumbens affect drug-induced circling and locomotion. *Exp Brain Res* 1987; 69:183-94.
22. Triarhou LC, Low LC, Ghetti B. Layer-specific innervation of dopamine-deficient frontal cortex in weaver mutant mice by grafted mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell Tiss Res* 1988;254:11-5.
23. Abrous N, Guy J, Vigny A, Calas A, Le Moal M, Herman JP. Development of intracerebral dopaminergic grafts: A combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. *J Comp Neurol* 1988;273:26-41.
24. Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnet SB, Gage FH. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand* 1983;522:9-18.
25. Abrous N, Guy J, Vigny A, Calas A, Le Moal M, Herman JP. Development of intracerebral dopaminergic grafts: A combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. *J Comp Neurol* 1988;273:26-41.
26. Nikkhah G, Olsson M, Eberhard J, Bentlage C, Cunningham MG, Björklund A. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: A detailed account of the methodology. *Neuroscience* 1994;63 (1):57-72.
27. Bartlett LE, Sadi D, Lewington M, Mendez I. Functional improvement with low-dose dopaminergic grafts in hemiparkinsonian rats. *Neurosurgery* 2004;55(2):405-12; discussion 412-5.