

TRASPLANTE DE CELULAS DOPAMINERGICAS MESENFALICAS FETALES EN STRIATUM Y SUBSTANTIA NIGRA PARS RETICULATA SIMULTANEAMENTE. EVALUACION CONDUCTUAL Y MORFOLOGICA

L. Blanco, P. Alvarez, N. Pavón, O. Castellanos, L. Castillo, C. Díaz, J. Pereira, R. Macías, R. Cruz, A. González, L. Díaz y R. Tadeo.**

Centro Internacional de Restauración Neurológica, Ministerio de Salud Pública, Avenida 25 No. 15805, entre 158 y 160, Playa, **Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 y J, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 17 de marzo de 1997.

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue estudiar otras estructuras blanco además del caudado-putamen donde el trasplante de células dopaminérgicas fetales pueda producir una mejor recuperación de los signos Parkinsonianos. Los animales recibieron trasplante de células dopaminérgicas fetales en el *striatum* y en la *substantia nigra reticulata* (SNr) ipsilateral a la lesión de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) o en ambos. Se consideraron los grupos experimentales siguientes: Trasplante en *striatum* y SNr (I) (n = 20); trasplante en SNr (II) (n = 20); trasplante en *striatum* (III) (n = 20); grupo control (lesión sin trasplante) (IV) (n = 20). La actividad rotatoria inducida por d-anfetamina (5 mg/kg i.p) fue estudiada 1, 2, 3 y 6 meses después del trasplante. Seis meses después del trasplante cinco animales de cada grupo experimental fueron perfundidos vía aorta ascendente y los cerebros fueron estudiados con técnicas inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa (TH). Los grupos I y III mostraron una disminución significativa en la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina en comparación con los grupos II y IV. El estudio morfológico reveló diferencias no significativas entre grupos con trasplante estriatal para todas las variables morfométricas estudiadas. Sin embargo, este mismo estudio en las láminas de *substantia nigra reticulata* del grupo I mostró un incremento significativo para todas las variables morfométricas estudiadas en comparación con el grupo II.

ABSTRACT. The aim of the present work was to determine new target regions, besides the caudate-putamen where the graft of dopaminergic fetal cells can produce a better recovery in the Parkinsonian signs on 6-OHDA lesioned rats. The animals received fetal dopaminergic neuronal grafts in the *striatum* and/or *substantia nigra pars reticulata* (SNr) ipsilateral to the lesion of the *substantia nigra pars compacta* (SNc). The experimental groups were as follow : grafted in *striatum* and SNr (I) (n = 20), grafted in SNr (II) (n = 20), grafted in *striatum* (III) (n = 20), control group (lesion without graft) (IV) (n = 20). The turning behaviour was analyzed one, two, three and six months after grafts under d-amphetamine effects (5 mg/kg i.p). Six months after graft five animals of each experimental group were perfused transcordially and the brains were studied for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. Group I and III showed a significantly decrease of rotatory activity in comparison with groups II and IV. The morphological study showed non-significant differences between groups with striatal graft for volume, density and number of TH⁺ cells. However, the same study in *substantia nigra* slices from group I showed a significant increase in volume, density and total number of surviving dopaminergic cells estimated in the graft in comparison with *substantia nigra* slices from group II.

INTRODUCCION

Es bien conocido que la degeneración de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta* (SNc) junto a la disminución drástica de la dopamina (DA) estriatal¹ son los cambios neuropatológicos y bioquímicos más importantes que caracterizan a la enfermedad de Parkinson (EP), cuyos síntomas clínicos clásicos son acinesia, rigidez, temblor y trastornos posturales.²

El trasplante de células fetales en *striatum* ha sido ampliamente utilizado como alternativa terapéutica de tipo restaurador para la EP,^{3,4} sin embargo, aún cuando se ha avanzado mucho en el conocimiento de cuáles son las mejores condiciones técnicas para el implante,⁵ así como los sitios del *striatum* cuya reinervación produce mayor recuperación funcional,⁶ aún no se ha obtenido la recuperación completa de los trastornos motores que se observan en el modelo experimental de Parkinsonismo por inyección intracerebral de seis hidroxidopamina (6-OHDA) en roedores.⁷ Últimamente se le ha prestado gran atención a la *substantia nigra pars reticulata*

(SNr) como blanco para el trasplante de células dopaminérgicas fetales teniendo en cuenta que este núcleo recibe inervación dopaminérgica procedente de la liberación dendrítica del neurotransmisor por parte de las células de la SNc que arborizan dentro de la SNr.⁸ Se sabe que la dopamina liberada a nivel de la SNr modula la actividad del receptor dopaminérgico D-1 localizado en la terminal estriatonigral el cual a su vez modula la liberación de ácido gammaaminobutírico (GABA) por parte de las células gabaérgicas de la SNr.⁸ Reinstaurar las concentraciones de dopamina en *striatum* y SNr simultáneamente (en este último núcleo también disminuyen significativamente los niveles de DA después de la lesión de los cuerpos celulares de la SNc),⁹ con el propósito de obtener una recuperación motora cualitativa y cuantitativamente superior es el objetivo más importante del trasplante de células dopaminérgicas fetales simultáneamente en *striatum* y SNr.

Considerando la tendencia actual en las investigaciones sobre trasplante, los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar el efecto del trasplante de células mesencefálicas fetales ubicado en *striatum* y *substantia nigra pars reticulata*

simultáneamente sobre la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina así como estudiar las características morfológicas y la morfometría del trasplante de este tipo celular en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó con el empleo de ratas Wistar machos de peso entre 200-250 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Ciudad de La Habana. Los animales se mantuvieron durante todo el tiempo del experimento en número de tres por cajas, con ciclo de luz 2hd / oscuridad 2hd. El acceso libre a los alimentos.

La lesión de la *substantia nigra compacta* derecha se realizó según se conoce.¹⁰ La solución de 6-OHDA se inyectó en las coordenadas estereotáxicas (mm) que se corresponden con la *substantia nigra compacta* según el Atlas de Paxinos y Watson.¹¹ AP = -4,4; L = 1,2; V = 7,8; Barra de Incisiones = -2,4.

Un mes después de la lesión con 6-OHDA, se estudió la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina (i.p) (5 mg/kg). La determinación de esta variable se hizo en un tiempo de 90 minutos con el empleo de un rotómetro electrónico ROTORCID. Sólo los animales que cumplieron con el criterio clásico de rotación para esta droga (siete vueltas por minuto o más) integraron los grupos experimentales de trasplante de tejido fetal.

Un mes después de la inyección de 6-OHDA, los animales que se consideraron bien lesionados fueron trasplantados con suspensiones celulares de mesencéfalo ventral fetal y con atención al sitio del trasplante, se constituyeron los grupos experimentales siguientes: Grupo I: *Striatum* (n = 20); Grupo II: SNr (n = 20); Grupo III: *Striatum* y SNr simultáneamente (n = 20); Grupo IV: Control (Sólo lesión sin trasplante) (n = 20) La cirugía del trasplante se realizó bajo anestesia (hidrato de cloral, 0,42 g/kg de peso) y la suspensión celular se inyectó con una jeringuilla Hamilton (10 μ L). En ambos núcleos la suspensión celular se inyectó en una sola trayectoria y un solo depósito. Para el *striatum* fue inyectado un volumen de 2 μ L de una suspensión celular de concentración de $1,5 \cdot 10^5$ cel./ μ L en las coordenadas estereotáxicas (mm) siguientes: AP = 1,00, L = 3,00, V = 5,00. En el SNr por su parte fue inyectado un volumen de 1 μ L de una suspensión celular de concentración $3 \cdot 10^5$ cel./ μ L en las coordenadas estereotáxicas (mm) siguientes: A = 5,20, L = 2,50, V = 8,00 en ambos núcleos la cantidad total de células inyectadas fue de 300 000 células.

Las suspensiones celulares fueron preparadas a partir del mesencéfalo ventral de embriones de rata mediante una dispersión enzimático-mecánica. El mesencéfalo ventral (que contenía la *substantia nigra* y el área tegmental ventral) fue disecado de embriones de ratas albinas Wistar (CENPALAB) con 14-15 d (E 14-15) (LCC 10-14 mm) y la preparación de la suspensión celular se realizó de acuerdo con lo reportado para esta técnica quirúrgica.¹² Uno, dos, tres y seis meses después del trasplante la actividad rotatoria de los animales fue estudiada bajo el efecto de la d-anfetamina. En cada mes en que se estudió la actividad rotatoria se calculó el porcentaje (%) que representó del valor de rotación pretrasplante.

Seis meses después del trasplante de tejido los animales aleatoriamente seleccionados para el procesamiento morfológico e inmunohistoquímico (diez animales de cada grupo experimental), fueron perfundidos vía aorta ascendente con 250 mL de disolución salina seguido de 400 mL de paraformaldehído. Los cerebros fueron post-fijados durante la noche e infiltrados en disoluciones de sacarosa (7, 15 y 30%). A

continuación, se realizó la congelación de las muestras con el empleo de isopentano enfriado en hielo seco.

Las secciones histológicas (20 μ m de grosor) fueron tomadas en número de dos consecutivas y se desecharon cuatro de ellas de igual grosor (20 μ m) desde que se localiza hasta que se deja de ver la estructura. Se tomó como referencia el trazo de la aguja de jeringuilla Hamilton. Las láminas con las secciones histológicas fueron procesadas para la visualización de células inmunoreactivas a la enzima tirosina hidroxilasa (TH).

Para el análisis morfométrico y el conteo de células, las secciones se colocan en un microscopio (Olympus Vanox-T) el cual tiene una cámara de video acoplada. A poco aumento (4X y 10X) se digitaliza la imagen del área correspondiente al trasplante con el empleo de una tarjeta de video (Video Blaster SE 100) y se procesan las imágenes con un sistema computarizado de análisis de imágenes (Digipat, EICISOFT, Cuba). En la imagen que se muestra en la pantalla del ordenador, se bordea el área del trasplante manualmente y se procede al cálculo del área de la región bordeada. Posteriormente, se cuentan los cuerpos celulares teñidos positivamente a la TH y para la selección de éstos se toman estructuras de apariencia neuronal que tengan al menos un proceso celular. Con la información del área (A) y el número de células en cada sección se procede a la estimación matemática del número total de células TH⁺ presentes en esa estructura.

El comportamiento de la actividad rotatoria en los diferentes grupos experimentales y tiempos de evolución, se estudió a través de un análisis de varianza bifactorial, seguido por una prueba de rangos múltiples de Duncan. La comparación de las diferentes variables morfométricas entre grupos experimentales se realizó por una prueba t de Student. Todo el procesamiento estadístico se hizo con el paquete de programas CSS.

RESULTADOS

Todos los animales incluidos en el estudio cumplieron el criterio clásico de número de vueltas bajo el efecto de la d-anfetamina (siete giros/min) como valor pre-trasplante, sin embargo, la actividad rotatoria inducida por esta droga no tuvo el mismo comportamiento en los cuatro grupos experimentales después del trasplante de tejido fetal. El análisis de varianza bifactorial (grupos experimentales X tiempos de evolución) reveló diferencias significativas en la conducta rotatoria entre grupos experimentales ($F_{(3, 176)} = 64,81 p < 0,001$) y diferencias no significativas entre tiempos de evolución ($F_{(3, 176)} = 0,476 p > 0,05$). La interacción entre uno y otro factor también resultó no significativa ($F_{(9, 176)} = 0,473 p > 0,05$). Las diferencias significativas entre grupos experimentales para esta variable fueron el resultado de la división de los grupos en dos subgrupos perfectamente distinguibles con diferencias muy significativas entre ellos ($F_{(3, 176)} = 6,481 p < 0,001$). El primer subgrupo reunió a los grupos experimentales con trasplante sólo en *striatum* y en *SNr* simultáneamente y el segundo subgrupo reunió a los grupos experimentales con trasplante sólo en SNr y control (Fig. 1).

Los grupos experimentales que se reunieron en el primero de los subgrupos antes mencionados, mostraron una notable disminución de su actividad rotatoria a partir del primer mes después del trasplante; disminución que se mantuvo durante todo el tiempo que duró el estudio.

Por su parte, la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina del grupo experimental trasplantado sólo en SNr mostró diferencias no significativas con el Grupo Control (Fig. 1).

Para ambos grupos experimentales la tasa de rotación se mantuvo muy alta durante todo el estudio, con valores muy similares a los de la variable antes del trasplante (Fig. 1).

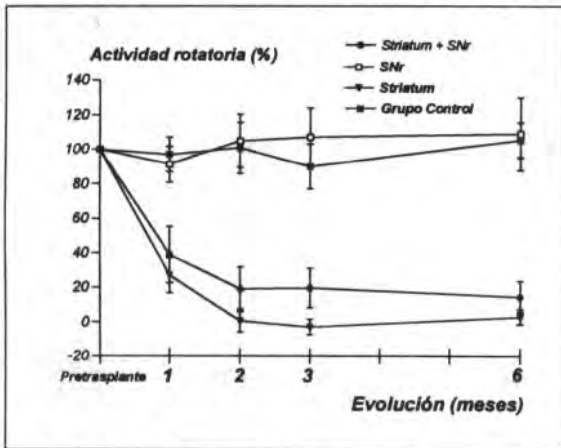


Fig. 1. Actividad rotatoria en el curso de los meses del estudio para cada grupo experimental ($n = 12$ para cada grupo experimental) ($X \pm EEM$).

El estudio morfológico e inmunohistoquímico realizado a los encéfalos de los animales trasplantados mostró los resultados siguientes: se observó ausencia casi total de inmunoreactividad al anticuerpo anti-TH en el *striatum* correspondiente al hemisferio lesionado (derecho), cuando se comparó con el lado no lesionado. Este hallazgo, además de servir para confirmar la lesión de la vía nigroestriatal, también permitió el reconocimiento de la región de trasplante y la identificación de las neuronas DAérgicas que sobreviven, pues estas son fácilmente identificables en una región donde prácticamente no existe inmunoreactividad a la enzima TH.

La generalidad de los trasplantes estriatales se localizaron en el sitio previsto de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas, o sea, en el tercio superior de la región anterior del *striatum* dorsal y fueron reconocidos por la presencia más o menos abundante de cuerpos y procesos neuronales inmunoreactivos al anticuerpo anti-TH (Fig. 2). Fue frecuente observar en estos trasplantes estriatales, procesos celulares que atravesaban la interfase trasplante-hospedero (Fig. 2). Al mismo tiempo, se observó mayor supervivencia en la periferia del sitio de implante que en la zona central de éste.

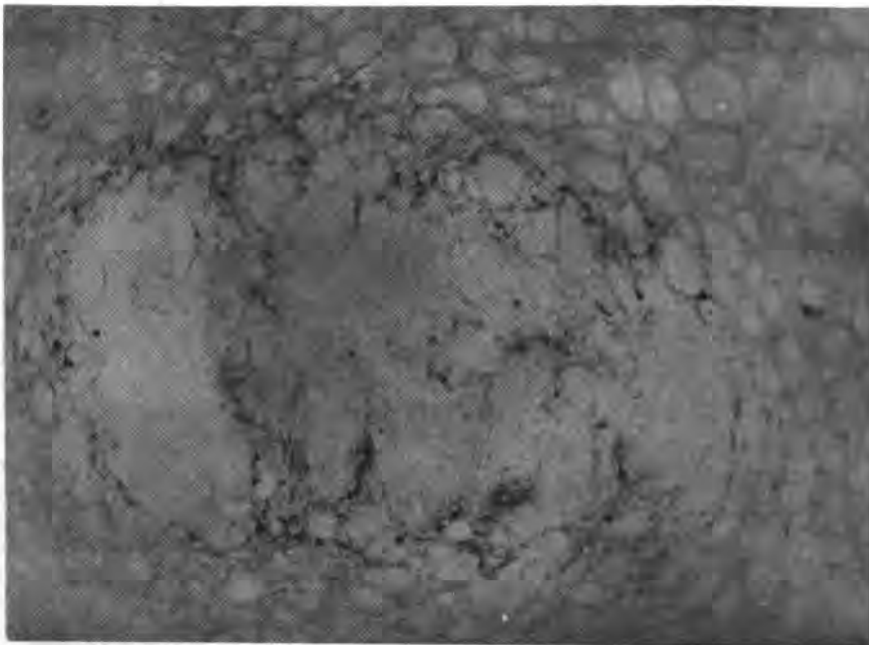


Fig. 2. Trasplante de células mesencefálicas fetales en *striatum*. El área del trasplante se puede observar rodeada de puntos negros que representan a las células TH⁺.

Los grupos experimentales con trasplante estriatal (trasplante en *striatum* y en *striatum* y SNr simultáneamente) exhibieron características morfológicas muy similares. Ninguna de las variables morfométricas estudiadas [volumen (mm^3), densidad (células TH⁺/ mm^3) y cantidad de células TH⁺] mostró diferencias significativas entre los grupos de trasplante estriatal (Tabla I).

El trasplante intranigral mostró baja supervivencia lo cual fue evidente en el pequeño número de células encontrado en la *substantia nigra* de los animales con trasplante sólo en esta estructura y simultáneamente con el *striatum*. A pesar de encontrarse algunos trasplantes muy bien diferenciados e integrados, los resultados apuntaron hacia que en la *substantia nigra pars reticulata* deben existir condiciones menos ventajosas para la supervivencia del trasplante. Por otra parte, resulta interesante que en los grupos experimentales con trasplante intranigral se observó mayor cantidad de fibras ner-

vias, lo cual contrasta con el relativamente bajo número de cuerpos neuronales. Este hecho hace que la densidad neuronal en la SN sea baja, ya que en muchos de los campos microscópicos estudiados el número de cuerpos celulares detectados fue muy bajo (Fig. 3).

Los grupos experimentales con trasplante intranigral mostraron diferencias significativas entre ellos para todas las variables morfológicas estudiadas (Tabla II).

DISCUSION

Varios criterios se aceptan como válidos para evaluar la funcionalidad del trasplante de células mesencefálicas fetales localizado a nivel del *striatum* dorsal de ratas previamente inyectadas con 6-OHDA. La disminución e incluso reversión de la conducta de giro inducida por diferentes drogas dopaminérgicas, es el criterio conductual clásico para afirmar que

el trasplante intraestriatal es capaz de disminuir la asimetría motora que exhiben los animales previamente lesionados.³ El aumento de los niveles de dopamina estriatal es otro de los criterios, en este caso bioquímico, frecuentemente empleado para examinar el efecto funcional del trasplante DA fetal intraestriatal.¹³ El establecimiento de conexiones funcionales

entre el trasplante mesencefálico fetal y las células estriatales hospederas es el criterio morfológico tradicional para aseverar que las células mesencefálicas fetales trasplantadas en el *striatum* denervado se integran bien en el cerebro hospedero incorporándose a su circuitería neuronal y participando funcionalmente de su neurotransmisión.¹⁴

TABLA I
Comparación entre el número de células TH⁺, el volumen y la densidad de los trasplantes estriatales

Variables	Grupo experimental				
	De trasplante en <i>striatum</i> (n = 4)		De trasplante en <i>striatum</i> y SNr simultáneamente (n = 10)		
	Intervalo	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	Intervalo	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	
Células TH ⁺	477,5 - 1 547,38	1 096,96 ± 228	113,04 - 6 156,04	1 670,04 ± 672	U = 9,00 p ≥ 0,05
Volumen ocupado por el trasplante (mm ³)	0,25 - 1,60	0,98 ± 0,3	0,11 - 2,6	0,89 ± 0,2	F = 1,82 p ≥ 0,05
Densidad de células TH ⁺ (cél./mm ³)	2 089		1 972		F = 1,80 p ≥ 0,05



Fig. 3. Trasplante de células mesencefálicas fetales en SNr. Se observa el área del trasplante y en ella puntos negros que representan a las células TH⁺.

En cuanto a los resultados de este trabajo, el hecho de que la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina disminuya significativamente en los grupos con trasplante intraestriatal es un resultado esperado y coincide plenamente con lo reportado por otros autores.^{3,13} Es bien conocido que las células mesencefálicas fetales trasplantadas en *striatum* son capaces de sintetizar y liberar DA¹³ y en presencia de d-anfetamina aumentan significativamente los niveles del neurotransmisor, lo cual expresado en términos de la actividad rotatoria se expresa como una disminución significativa de ella debido a la recuperación de los niveles de dopamina estriatales.¹³ El hecho de que la actividad rotatoria inducida por esta droga muestre diferencias no significativas entre los períodos en estudio, habla a favor de que los mecanismos que rigen el com-

portamiento de esta variable y que están relacionados con la actividad de las células trasplantadas, se manifiestan desde etapas bien tempranas del trasplante, o sea un mes después de su realización, ya se puede hablar de una modificación significativa de la conducta rotatoria que se mantiene en el tiempo.¹⁴ Varios autores han referido que es necesaria la presencia del tejido trasplantado e inclusive de las neuronas dopaminérgicas, para que el efecto funcional persista y que sólo retirando el tejido trasplantado se produce un retorno a la condición de rotación pre-trasplante.¹⁴

En relación con los resultados del estudio morfológico e inmunohistoquímico, éstos apuntan hacia una buena reiner- vación del *striatum* dorsal con un volumen medio ocupado por el trasplante y una densidad de células TH⁺/mm³, muy simi-

lares a los reportados por el grupo de Nikkhah¹⁵ para un procedimiento quirúrgico de macrotrasplante. La cantidad de células TH⁺ estimadas para los grupos experimentales de trasplante intraestriatal es también similar a lo reportado para macrotrasplante estriatal.¹⁶ Se ha señalado¹⁶ que 162 células TH⁺ ha sido el menor conjunto de células estimadas en el *striatum* de un animal trasplantado con una suspensión de células de mesencéfalo ventral fetal y que aún para esta cantidad "umbral" de células TH⁺, se ha encontrado una notable recuperación conductual. Estos trabajos apuntan que para un intervalo entre 300-500 células TH⁺ que sobrevivían en el trasplante, se crea un llamado efecto "techo" en la actividad rotatoria, lo cual significa que cantidades superiores de células producirán muy poco o ningún efecto adicional sobre la actividad rotatoria. Se señala además, que un intervalo entre 100 y 200 células TH⁺ en un *striatum* trasplantado es suficiente para producir un crecimiento de fibras y promover un 50 % de reducción en la asimetría motora inducida por d-anfetamina. Este intervalo de valores representa sólo aproximadamente entre el 1-2 % de las neuronas que forman la vía nigroestriatal endógena en las ratas.¹⁷ Teniendo en cuenta lo anterior, el

estimado medio de células TH⁺ calculado para el *striatum* de los dos grupos experimentales con trasplante intraestriatal de este trabajo, rebasa ampliamente el valor mínimo reportado para esta variable; pero aún resulta más interesante que haciendo un análisis casuístico, el animal cuyo valor estimado de cantidad de células TH⁺ es inferior al reportado (113,04 células TH⁺) muestra también una fuerte recuperación conductual expresada a instancias de la reversión de la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina. El grupo de Brundin¹⁶ ha reportado que pequeños trasplantes intraestriatales que producen una reinervación muy dispersa tienen anormalmente altas tasas de síntesis y liberación de dopamina, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo autoregulatorio dentro del *striatum* reinervado por trasplante, muy similar al que se conoce que existe en el sistema nigroestriatal intrínseco después de una lesión parcial. De acuerdo con este principio regulador el incremento en el tamaño y la densidad de la innervación normaliza gradualmente la tasa de síntesis y liberación del neurotransmisor, lo cual indudablemente constituye un importante mecanismo de ajuste a la neurotransmisión dopaminérgica en el *striatum* reinervado por trasplante DA fetal.¹⁷

TABLA II
Comparación entre el número de células TH⁺, el volumen y la densidad de los trasplantes intranigrales

Variables	Grupo experimental				
	De trasplante en SNr		De trasplante en <i>striatum</i> y SNr simultáneamente		
	Intervalo	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	Intervalo	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	
Células TH ⁺	13,52 - 246,05	110,72 ± 34,97	60,56 - 2135,00	729,97 ± 282,6	F = 83,67 p ≤ 0,001
Volumen ocupado por el trasplante (mm ³)	0,02 - 0,24	0,11 ± 0,04	0,02 - 0,78	0,22 ± 0,1	F=7 ,54 p ≤ 0,05
Densidad de células TH ⁺ (cél./mm ³)		1 119,90		2 509,52	F = 14,69 p ≤ 0,05

Retomando el estudio de la actividad rotatoria; el comportamiento de esta variable en ambos grupos experimentales con trasplante intraestriatal coincide con lo reportado por el grupo de Robertson.⁹ Específicamente para la d-anfetamina, este colectivo reportó una ligera aunque no significativa mejoría mayor de la actividad rotatoria para el grupo experimental trasplantado simultáneamente en ambos núcleos.

En relación con la actividad rotatoria de los grupos con trasplante solo en SNr y control (sin trasplante), esta variable mostró un comportamiento muy similar para ambos grupos experimentales, lo cual coincide con lo reportado por el grupo de Robertson⁹ el cual señala que el trasplante DA intranigral con los procedimientos antes mencionados no mejora la asimetría motora expresada en términos de la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina.⁹

Sin embargo, esta misma variable en el grupo experimental con trasplante simultáneamente en *striatum* y SNr exhibe un comportamiento que ni siquiera es intermedio entre la actividad rotatoria de los grupos con trasplante sólo en cada una de estas estructuras por separado. La actividad rotatoria del grupo con trasplante en ambos núcleos es significativamente diferente del grupo con trasplante sólo en SNr y muy

similar al grupo con trasplante estriatal, lo cual sugiere que este trasplante ejerce un efecto predominante en comparación con el intranigral sobre la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina.⁹ Por otra parte, el techo de esta actividad es bajo más aún tratándose de la inducida por una sola droga y pueden quedar enmascarados los efectos del trasplante a nivel de de la SNr.

El análisis de los resultados morfológicos e inmunohistoquímicos de las láminas procedentes de cerebros de animales con trasplante intranigral, es también muy interesante. Las diferencias significativas que se detectan entre los grupos con este trasplante para las tres variables morfológicas estudiadas (volumen medio ocupado por el trasplante, densidad de células TH⁺/mm³ y cantidad total de células TH⁺) hablan a favor de una mayor supervivencia e integración de las células trasplantadas en la SNr de los animales en los que simultáneamente se trasplantaron células mesencefálicas ventrales fetales en *striatum*.

El volumen medio que ocupa el trasplante celular en la SNr del grupo con trasplante en ambos núcleos representa el doble del volumen que ocupa el trasplante celular del grupo experimental con trasplante sólo en SNr lo cual pudiera estar relacionado con el aumento significativo en el número de

células que sobreviven. Se ha reportado que la supervivencia neuronal está asociada con un fenómeno de competencia por agentes derivados del blanco al cual deben reinervar las células implantadas. Las neuronas que no alcanzan su blanco o que pierden en la competencia por la "cantidad adecuada" de sinapsis, pierden el apoyo del blanco y mueren.¹⁸

En general, para los dos grupos de trasplante intranigral la supervivencia de las neuronas DAérgicas fetales puede evaluarse de baja aún cuando sea superior y significativamente diferente en el grupo con trasplante simultáneamente en *striatum* y SNr. Sin embargo, no debe explicarse el aumento del volumen medio ocupado por el trasplante exclusivamente a expensas de un aumento del número de células que sobreviven si se tiene en cuenta la diversidad de tipos celulares incluidos en la suspensión celular¹⁹ y que sólo un pequeño porcentaje de ellos son neuronas DAérgicas y el resto constituye una mezcla heterogénea de tipos celulares no dopaminérgicos y precursores gliales contenidos en el mesencéfalo ventral.¹⁹ Más bien, los autores consideran que la combinación de evidencias experimentales como el crecimiento de procesos y fibras de las células que sobreviven, junto al aumento significativo en el número de éstas, pudiera explicar el aumento tan drástico de volumen ocupado por el trasplante localizado a nivel de la *substantia nigra pars reticulata* de los animales simultáneamente trasplantados en el *striatum*.

El examen conjunto de los resultados permite afirmar que las células DAérgicas fetales trasplantadas en el *striatum*, sobreviven y se integran al tejido hospedero garantizando la reinervación estriatal, en la SNr una suspensión celular con la misma cantidad de células totales e inyectada con idéntica técnica quirúrgica rinde una supervivencia aproximadamente 10 veces menor expresada en términos de cantidad de células que sobreviven.

En conclusión, estos resultados esencialmente apuntan hacia una influencia positiva del trasplante intraestriatal sobre el trasplante intranigral que parece expresarse en un aumento de los niveles de DA nigrales (datos que no se muestran) y en una mejor supervivencia del trasplante fetal intranigral aunque estos elementos aporten poco al mejoramiento de la asimetría motora expresada como actividad rotatoria inducida por d-anfetamina. A nivel del *striatum* y en la vecindad del trasplante es posible pensar que las células trasplantadas viven, se integran al tejido hospedero, sintetizan y liberan DA.

Los autores no descartan la posibilidad de que las modificaciones funcionales que se producen en la neurotransmisión a través de los ganglios basales, como resultado de la reinervación estriatal, que por demás alcanzan los núcleos de salida de información como el Gpm y la SNr, favorezcan la reinervación de esta última por mejorar las condiciones del blanco para las células trasplantadas. Este razonamiento conduciría a pensar que indirectamente la reinervación estriatal

desempeña un papel positivo en el desarrollo y crecimiento, así como en los mecanismos que garantizan la supervivencia celular del trasplante "sembrado" a nivel de la SNr.

BIBLIOGRAFIA

1. Carlsson A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the central nervous system. **Pharmacol. Rev.**, **11**, 490, 1959.
2. DeLong M. Primate Models of Movement Disorders of Basal Ganglia origin. **Trends in Neurosciences**, **13**, 281, 1990.
3. Björklund A. and Stenevi U. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. **Brain Research**, **177**, 555, 1979.
4. Brundin P., Gage F., Stenevi U. and Björklund A. Intracerebral grafts on neuronal cell suspensions. In: *Neuronal Grafting in the Mammalian CNS*. A. Björklund y U. Stenevi (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 51-59, 1985.
5. Freed W. Substantia Nigra Grafts and PD: From animal experiments to human therapeutic trials. **Restorative Neurology and Neuroscience**, **3**, 109, 1991.
6. Dunnett S., Björklund A. and Stenevi U. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV Behavioural recovery in rats with unilateral implants of nigral cell suspensions in different forebrain sites. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, **52**, 29, 1983.
7. Nikkhah G., Cunningham G. and Björklund A. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. **J. Neurosci.**, **6**, 3449, 1994.
8. Robertson G., Damsna G. and Fibiger C. Characterization of dopamine release in the substantia nigra by in vivo microdialysis in freely moving rats. **J. Neurosci.**, **11**, 2209, 1991.
9. Robertson G., Fine A. and Robertson H. Dopaminergic grafts in the *striatum* reduce D₁ but not D₂ receptor-mediated rotation in 6-OHDA-lesioned rats. **Brain Research**, **53**, 304, 1991.
10. Ungerstedt U. and Arbuthnot G. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-OHDA lesions of the nigrostriatal dopamine systems. **Brain Res.**, **24**, 485, 1971.
11. Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd edn Academic Press, New York, 1986.
12. Dunnett S. and Björklund A. In *Neural Transplantation. A practical Approach*. Edited by S.B. Dunnett y A. Björklund. 1-19, 1993.
13. Freed W., Perlow M., Karoun A. and Olsson L. Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long term behavioral, biochemical and histochemical studies. **Annals of Neurology**, **8**, 511, 1980.
14. Rioux L., Gaudin D., Bui L. and Bedard P. Correlation of functional recovery after a 6-OHDA lesion with survival of grafted fetal neurons and release of dopamine in the *striatum* of the rat. **Neuroscience**, **40**, 123, 1993.
15. Nikkhah G., Cunningham G. and Björklund A. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson Model. **Brain Research**, **8**, 133, 1994.
16. Björklund A. and Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS. In: *Handbook of chemical neuroanatomy 2: Classical Transmitter in the CNS*. Elsevier, Amsterdam, 55-122, 1984.
17. Fischer W., Gage F. and Björklund A. Degenerative changes in forebrain cholinergic correlate with cognitive impairments in aged rats. **Eur. J. Neurosci.**, **1**, 87, 1989.
18. Fisher L. and Young L. Electrophysiological characteristics of cells within mesencephalon suspension grafts. **Neuroscience**, **12**, 1109, 1991.