

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS ICBP "VICTORIA DE GIRÓN
CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA**



**TRASPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MÉDULA ÓSEA EN
UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATA PARA LA ENFERMEDAD DE
HUNTINGTON**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. Teresa Serrano Sánchez

Tutor: Prof. Tit. Lic. Jorge Alberto Bergado Rosado, Dr.Cs.

La Habana

2017

*Existen dos cosas
que impiden que una
persona realice sus sueños:
Creer que son imposibles
o que, gracias a un repentino
vuelco de la rueda del destino,
ver que se transforma
en algo posible cuando menos lo esperaba.
La oportunidad está ante usted.
Dé un paso al frente, seleccione lo que quiera,
forje un plan y persista en su realización.*
Paulo Coelho

***A mis dos hijos:
Iván y Fabio Avilio***

AGRADECIMIENTOS

Hoy deseo expresar mi reconocimiento y mi gratitud a todas las personas que me apoyaron y me animaron pues sin ellas este trabajo no podría ser hoy una realidad.

Ante todo quiero agradecer a mis compañeros del área básica del CIREN por haber compartido tantos años de trabajo y haber podido contar con ellos siempre, especialmente les doy las gracias:

A mis compañeras del Laboratorio de Neuroinmunología: Nancy Pavón, Lourdes Lorigados y María de los Ángeles Robinson por prestarme ayuda profesional siempre que lo necesité, por ser las primeras tutoras y asesoras de este trabajo. Por dedicarle horas de su tiempo a la revisión de cada uno de los documentos emanados de este trabajo y por enriquecerlo con sus críticas y sus sugerencias.

A María Elena González y a Lisette Blanco: Por no haberme negado nunca su ayuda profesional, ni sus sugerencias tan bien recibidas, por la revisión profunda que le realizaron al documento de tesis, sirviendo de asesoras una y otra vez, por la incondicionalidad en las largas horas de trabajo, por darme el apoyo emocional que siempre necesité, por su confianza y afecto, por su amistad.

A Mawy por su cariño, su gran profesionalidad y eficiencia que me permitieron contar con cuanto material bibliográfico necesité y su apoyo incondicional en la encuadernación de los documentos.

A William Almaguer, Daymara Merceron, Mei-Le Díaz, Ivette Fernández, Bárbara Estupiñan, Esteban Alberti, Isabel Fernández, Yamilé y Karelys de la Cuétara: Unos por haberme instruido en la aplicación de una u otra prueba conductual, en el manejo de sus datos, en la interpretación adecuada de sus resultados, y en el uso de programas. Otros por haber puesto a mi disposición su experticidad en el campo de las ciencias morfológicas y las técnicas inmunohistoquímicas, así como por haberme apoyado con la realización del estudio de expresión de factores neurotróficos y técnicas de aislamiento celular.

Al Departamento de Neurofisiología en pleno, con especial énfasis en Margarita Báez, por la exhaustiva revisión que le realizó al documento de tesis y por su preocupación en que me llegara la información necesaria.

A Jorge Bergado: Mi tutor, mi maestro, mi guía, mi impulsor hasta los últimos acontecimientos de esta tesis, por haber asesorado cada etapa del diseño experimental, por haberle aportado sus profundos conocimientos sobre el tema, por su talento, por su experticidad, por ser práctico y competente, por su humanismo, por su amistad. Le doy mil gracias.

A nuestros técnicos de laboratorio y del salón de operaciones Asiel y Magalys, por su apoyo en las innumerables horas de cirugía experimental que han permitido desarrollar este trabajo.

A los técnicos del vivario del CIREN Carlos y Dasiel, y muy especialmente al Dr. Alain García, por su preocupación y eficiente quehacer en el manejo y cuidado de los sujetos experimentales que formaron parte de este estudio.

A Maylen, Rafa, Karla y Grethel por el granito de arena que en su momento me aportaron para dar un paso mas adelante.

Al Dr. Macías, por su preocupación en nuestra superación y su extraordinario apoyo durante estos años.

A Marcela, Renato, Migue, Quiqui, Fernando Lazo, María del Pilar, Mercedita Crespo y Bertica por todo el cariño y disposición de ayuda.

A los compañeros que ya no están con nosotros pero que siempre estuvieron dispuestos a compartir generosamente sus conocimientos y colaboración como Lazara Castillo, Ivis Martínez y Rocío García.

A los doctores Giselle Pentón, Héctor Pérez Saad y Diana García del Barco, así como a los doctores Juan Bender del Busto y Alina González Quevedo por la excelente oponentía realizada en la predefensa y defensa, por el rigor científico en sus sugerencias, por su profesionalidad y ética, así como a la Dra. Sandra Rodríguez Salgueiro por enseñarme en el último momento el fascinante mundo de la morfometría.

Al Dr. Nivaldo Hernández, por ser mi profesor de medicina más querido, por su talento, por su empuje para que terminara este proyecto de tesis y haberme incitado a adentrarme en el mundo de la investigación.

A la familia que vivió junto a mí por más de 30 años: Iván Díaz Armesto, padre de mis dos hijos, Jorge y Abilio Díaz e Hilda Armesto, sin reclamar horas de ocio, atención, cuidado y dedicación.

A mi valiente y hermosa madre por haberme guiado por el camino correcto a pesar de las adversidades, por su ejemplo de luchar en la vida y por la vida, por haberme apoyado tanto material como espiritualmente para la obtención de este grado científico que estamos defendiendo hoy, por su inmenso cariño y amor.

A mi hermano Manolo ejemplo de disciplina y perseverancia, a mis hermanas Ana Gloria, Xiomara y Zorayda, por estar pendiente en todo momento de la realización de mis sueños.

A mi compañero Roberto Rodríguez por ofrecerme un mundo que no conocía. Por su inmensa e infinita comprensión en todo este tiempo, por compartir los deseos conmigo de completar este proyecto de tesis y por su inmenso amor.

Y finalmente quiero agradecer a mis dos hijos Iván y Fabio Avilio que son las joyas más valiosas de mi vida y que con su mera existencia me impregnaron de luz y fuerza para llegar hasta aquí.

A todos, Muchas gracias

SÍNTESIS

El presente trabajo aborda el estudio del trasplante de células mononucleares de médula ósea (CMMO) en un modelo de lesión estriatal en rata por inyección de ácido quinolínico, con el objetivo de evaluar su capacidad neurorestaurativa y su efecto sobre la función cognitiva y la conducta motora. Adicionalmente fueron objeto de estudio los cambios morfológicos y moleculares que aparecen en el cerebro de las ratas bajo estas condiciones. Se emplearon técnicas de cirugía estereotáctica, histoquímicas e inmunohistoquímicas, ensayo inmunoenzimático, biología molecular y estudios conductuales. Se constató que la inyección de ácido quinolínico en el estriado induce una pérdida neuronal que se traduce en trastornos cognitivos y motores y que las CMMO trasplantadas son capaces de sobrevivir, desarrollarse y tener un efecto positivo sobre la recuperación cognitiva y motora posiblemente relacionado con su capacidad de modificar la expresión génica y las concentraciones de BDNF, lo que forma parte del sustrato fisiológico que subyace al efecto neuroprotector que se atribuye a estas células. Se demostró en las células trasplantadas la expresión de proteínas neuronales como la proteína neuronal nuclear (NeuN, de sus siglas en inglés neuronal nucleus) y la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, de sus siglas en inglés glutamic acid decarboxylase), lo que sugiere la diferenciación de estas células a un fenotipo neuronal gabaérgico que sustentaría la utilidad del trasplante de CMMO como alternativa de tratamiento para pacientes con Enfermedad de Huntington.

RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

AQ	ácido quinolínico
BDNF	factor de crecimiento derivado del cerebro
CMMO	células mononucleares de médula ósea
ChAt	colina acetil transferasa
DMEM	medio dulbecco's modificado de eagle's
GB	ganglios basales
GP	globo pálido
GPL	globo pálido lateral
GPM	globo pálido medial
GAD	descarboxilasa del ácido glutámico
GABA	ácido γ -aminobutírico
Glu	glutamato
GFAP	proteína ácida fibrilar de la glia
LAM	laberinto acuático de morris
LAQ	lesión con ácido quinolínico
mcm	micrómetro
NeuN	proteína neuronal nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPP	núcleo pedúnculo pontino
NST	núcleo subtalámico
SNr	sustancia negra reticulata
SNe	sustancia negra compacta
TpCMMO	trasplante de células mononucleares de la médula ósea
TpDMEM	trasplante con vehículo DMEM
3-NP	ácido 3-nitropropiónico

TABLA DE CONTENIDO

SÍNTESIS	5
RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	6
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
I. Enfermedad de Huntington	17
II. Organización estructural y funcional de los ganglios basales	18
III. Alteraciones en el funcionamiento de los GB en la enfermedad de Huntington	22
IV. Bases moleculares y patogénicas de la enfermedad de Huntington	24
V. Modelos experimentales en la enfermedad de Huntington	28
VI. Fármaco terapéutica actual en la enfermedad de Huntington	34
VII. Tratamientos potenciales para la enfermedad de Huntington	34
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Diseño Experimental	38
Diagrama temporal del diseño experimental	39
Implementación del modelo de enfermedad de Huntington	40
Trasplante de células mononucleares de médula ósea	49
Pruebas conductuales	49
Estudios moleculares	54
Estudios morfológicos cualitativos	61
Análisis morfológico cuantitativo	63
Análisis de los datos	64

RESULTADOS	65
Implementación del modelo de enfermedad de Huntington	65
Pruebas conductuales	71
Estudios moleculares	79
Estudios morfológicos	81
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	105
RECOMENDACIONES	106
AUTOBIBLIOGRAFÍA	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	131

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa de origen hereditario que se caracteriza desde el punto de vista neuropatológico por atrofia y pérdida celular progresiva predominantemente en el estriado y la neocorteza (1;2). Clínicamente se identifica por movimientos involuntarios anormales de tipo coreico, disfunción cognitiva y trastornos psiquiátricos (3-5). La enfermedad es causada por una expansión del trinucleótido CAG (citocina-adenina-guanina; que codifica glutamina), en el exón 1 del gen de la huntingtina (6). La función normal de la huntingtina se desconoce, aunque se ha señalado que puede estar involucrada en la señalización celular, en el mantenimiento de la estructura cíclica del monofosfato de adenosina, así como previniendo la toxicidad neuronal (7). Las evidencias sugieren que la unión de la huntingtina mutada a la proteína Rhes, que se localiza selectivamente en el estriado, es necesaria para que se produzca la toxicidad celular (8). Sin embargo, aunque permanece sin explicarse el mecanismo por medio del cual la proteína causa toxicidad, existen evidencias de que la interacción defectuosa de los receptores metabotrópicos de glutamato, del grupo I, con la huntingtina mutada pudiera ser la génesis del daño de las células estriatales (9).

La enfermedad está distribuida en todo el mundo en igual proporción entre hombres y mujeres. La prevalencia se considera entre 5 y 10 casos por cada 100.000 habitantes (10), algo menor en países del este asiático y en poblaciones de raza negra (11). Los estudios genealógicos han permitido situar el origen de la enfermedad en el oeste de Europa (Francia, Alemania y Holanda) (12;13), donde la emigración de estas familias hacia América, Inglaterra, Sudáfrica y Australia, ha sido el origen de la extensión de la enfermedad (14). Las mayores tasas de prevalencia se dan en la región del lago de Maracaibo, Venezuela (15), en la isla de Tasmania (Sur de Australia) (16) y en Moray Firth de Escocia (17).

En Cuba no se conoce exactamente cual es la frecuencia de aparición de esta enfermedad. Se han estudiado decenas de pacientes y sus familiares y el resultado de tales estudios indica que al comparar su frecuencia con otras enfermedades neurodegenerativas, esta enfermedad no es común en nuestro medio. Un estudio reciente indica que en la región oriental del país hay una frecuencia notable de la enfermedad de Huntington lo que sugiere un efecto fundador que merece atención especial, ya que se ha encontrado en esta población una baja variabilidad genética del gen de la huntingtina que es el implicado en la enfermedad de Huntington (18). El resultado de este estudio tiene implicaciones importantes para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con la enfermedad de Huntington en Cuba (18). Existen diferentes técnicas que permiten identificar a los portadores de esta enfermedad antes de desarrollarse los síntomas e incluso intraútero. El diagnóstico molecular puede ser preimplantacional, presintomático y sintomático; los dos últimos se realizan en Cuba (18).

El tratamiento de la enfermedad de Huntington se ha enfocado en varias direcciones (1), incluyendo el tratamiento etiológico, los síntomas clínicos, tratamiento sustitutivo, preventivo protectores y neurorestauradores. El tratamiento sintomático de la corea es beneficioso en algunos individuos, lo cual tiene un efecto favorable sobre la función motora, la calidad de vida, y seguridad del paciente (19). También se considera el tratamiento para la distonía y otros aspectos de la esfera no motora. En general los tratamientos con resultados positivos se dirigen a los aspectos motores de la enfermedad, con el riesgo de los efectos colaterales que implica el uso de determinados fármacos.

A pesar del esfuerzo realizado en la búsqueda de tratamientos que permitan tratar con éxito la enfermedad, en la actualidad no existen terapias que detengan o retarden su progresión, por lo que desde hace más de dos década se desarrollan alternativas terapéuticas basadas en la utilización de células madre, las que se sustentan de forma importante en la disponibilidad de modelos experimentales de la enfermedad que permiten el estudio de la factibilidad de estas células con fines terapéuticos. En el presente, algunos de los modelos de la enfermedad de Huntington más utilizados

para ensayar terapias celulares son los inducidos por toxinas. Estos producen patrones de pérdida celular en el cerebro de los animales que simulan o reproducen las alteraciones típicas de la enfermedad, tanto conductuales, como bioquímicas y patológicas, con base en el mecanismo de excitotoxicidad y en la alteración del metabolismo energético mitocondrial (20-23). Otra clase de modelo experimental es el que utiliza un gen mutado, que permite la generación de ratones transgénicos portadores de las diferentes formas descritas para este gen (24-26), lo cual posibilita el estudio de la etiología de la enfermedad.

Ambos grupos de modelos aportan un cúmulo de evidencias de disfunción y muerte celular que favorecen el estudio de la fisiopatología de la enfermedad y de los síntomas de estos pacientes (27), quedando disponibles para evaluar el trasplante celular como posible alternativa de tratamiento para estos enfermos. El uso de uno u otro modelo experimental depende del propósito y la pregunta particular de interés de la investigación. En los modelos genéticos se puede reproducir el defecto primario, sin embargo, en ellos no se puede remedar toda la sintomatología clínica que se observa en la enfermedad de Huntington (28). Por su parte los modelos tóxicos, aunque no tienen el daño genético sí reproducen los trastornos antes descritos (29;30)

Desde hace varias décadas se conoce que existe reemplazo neuronal en el cerebro de mamíferos adultos (31;32). La neurogénesis se produce en ciertas zonas cerebrales a partir de células madre neurales como son los nichos neurogénicos de la zona subgranular del giro dentado hipocampal, el área subventricular del bulbo olfatorio y el área subependimaria en la médula espinal (33). Dicha neurogénesis se encuentra limitada y depende de la actividad de los astrocitos que secretan factores neurotróficos y citocinas, que generan un microambiente inductor del desarrollo y la diferenciación neuronal en el área del hipocampo (33).

El desarrollo en los métodos de tratamiento restauradores favorece que en el presente se traten de encontrar fuentes celulares alternativas no neurales para el trasplante, ya que la fuente de tejido fetal

utilizada hasta el momento requiere de estrictos controles de calidad, sin desconocer los problemas éticos que entraña el uso de tejido fetal humano obtenido durante el embarazo, lo cual ha sido motivo de interminables polémicas, rechazos y aspectos legales (34;35).

Actualmente se debate que una fuente alternativa de tejido para el trasplante neural en la enfermedad de Huntington, pudieran ser las células madre no neurales, que por definición son células que se caracterizan por su capacidad de autorenovación a lo largo de la vida, y que desarrollan funciones de homeostasis celular y de reparación y regeneración de tejidos, así como por responder a señales o estímulos presentes en el microambiente donde se encuentran, lo que induce su diferenciación hacia linajes celulares con características y funciones especializadas (36). Las células madre tienen un gran potencial para el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas que hasta el momento son incurables, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (37-41).

Existen varias fuentes potenciales de células madre para el trasplante, dentro de las cuales se encuentran: 1) células madre embrionarias derivadas de los blastocitos, 2) células progenitoras pluripotentes de embriones, fetos o neonatos 3) células progenitoras de la zona subventricular adulta, 4) células germinales epidérmicas, 5) células madre no neuronales de sangre del cordón umbilical, y 6) otro rango de células madre no neuronales que pueden tener la capacidad de diferenciarse a células neurales cuando se encuentran en un ambiente con señales apropiadas (42).

La posibilidad de que la población de células madre sea potencialmente neurogénica, genera una cantidad sustancial de estudios que abre una oportunidad para el trasplante autólogo, dada la existencia de un acceso fácil al tejido para ser utilizado en el trasplante (43;44). Sin embargo, aunque hay grupos que reportan la capacidad de estas células para diferenciarse en neuronas (45) existen algunas controversias en la literatura relacionadas con este aspecto, que evidencia en algunos casos que tales resultados son consecuencia de varios eventos de fusión celular más que de una

transdiferenciación verdadera (46).

Existen reportes en la literatura que demuestran que las células madre de médula ósea son capaces de producir factores neurotróficos como el factor de crecimiento derivado del cerebro; BDNF (de sus siglas en inglés Brain Derived Neurotrophic Factor) y el factor de crecimiento de nervio; NGF (de sus siglas en inglés Nerve Growth Factor)(47). Debido a su potencialidad para producir factores tróficos y originar diferentes tipos de células, estas células, podrían ser una fuente ideal para la neuroprotección y restauración celular en enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Huntington.

Desde hace varios años se consideró, dentro del grupo de células madre no neuronales, a la célula madre hematopoyética como la única célula de la médula ósea con capacidad regenerativa. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la composición de la médula ósea es más compleja, ya que en ella se identifica un grupo heterogéneo de células madre adultas. Dado el potencial de crecimiento y diferenciación que tienen estas células, demostrado en gran medida en el campo de las investigaciones, emergen algunas preguntas sobre este sistema de células: ¿Pueden estas células sobrevivir cuando son trasplantadas en los modelos que se han diseñado para remedar la enfermedad de Huntington y tener efecto sobre las funciones perdidas? ¿Pueden estas células convertirse en neuronas? ¿Cuál es el mecanismo de acción de estas células cuando se utilizan en la terapia regenerativa? En la literatura actual se discute acerca de este tema y para la mayoría de las fuentes celulares estas interrogantes siguen siendo el foco central de los estudios (48-50) En la actualidad no existe una terapia efectiva para restaurar la neurodegeneración que aparece en la enfermedad de Huntington.

Estos antecedentes nos motivaron a investigar de manera experimental los efectos restaurativos que pudieran tener las células mononucleares de la médula ósea (CMMO) en el modelo de la enfermedad de Huntington por lesión estriatal con ácido quinolínico en ratas, por lo que enunciamos la siguiente

hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

El trasplante de células mononucleares de médula ósea en el estriado lesionado de ratas revierte las alteraciones conductuales, morfológicas y moleculares que aparecen en este modelo neurotóxico de la enfermedad de Huntington.

Objetivo general

Evaluar la capacidad del trasplante de CMMO para revertir o atenuar los déficits motores, cognitivos y celulares en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington.

Objetivos Específicos

1. Implementar el modelo experimental de la enfermedad de Huntington por medio de la lesión estriatal con ácido quinolínico en rata
2. Evaluar el posible efecto protector de las CMMO trasplantadas sobre la función cognitiva y la conducta motora en el modelo de lesión estriatal con ácido quinolínico
3. Demostrar los cambios morfológicos y moleculares que aparecen en el cerebro de las ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con CMMO

IMPORTANCIA TEÓRICA

Se postula que las células madre originan tipos celulares específicos en los tejidos donde son trasplantadas. Se desconocen, sin embargo, los mecanismos moleculares y la forma en que estas células una vez implantadas pueden actuar sobre el tejido lesionado e influir sobre la conducta en el modelo de la enfermedad de Huntington. Los datos obtenidos en este estudio aportaron conocimientos sobre estos aspectos al evaluar tanto mecanismos al nivel molecular, como aspectos

relacionados con la conducta motora y cognoscitiva de los sujetos experimentales sometidos al trasplante de CMMO.

IMPORTANCIA PRÁCTICA Y SOCIAL

El trasplante de células madre es una estrategia terapéutica que en la actualidad se utiliza como alternativa de tratamiento para diferentes enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, existen enfermedades que pertenecen a este grupo, para las que todavía se desconoce el efecto que estas células tienen sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El aporte práctico y social de estos resultados consiste en la demostración de la utilidad del trasplante de CMMO en el modelo experimental de la enfermedad de Huntington, para corregir los cambios morfofuncionales que acontecen tras la degeneración neuronal, si tenemos en cuenta que esta enfermedad va teniendo cada vez una incidencia mayor, sobre todo en aquellos países, como el nuestro, en que la expectativa de vida va siendo cada vez más alta.

La reproducción del efecto neurorestaurador del trasplante de CMMO en estudios clínicos constituirá un indiscutible aporte a la medicina contemporánea, así como una incuestionable ayuda al tratamiento y al aumento de la calidad de vida de los pacientes con la enfermedad de Huntington, con el consiguiente beneficio a todos los miembros de la familia y a la sociedad.

NOVEDAD CIENTÍFICA

Los resultados que se muestran en esta tesis constituyen el primer ensayo preclínico en nuestro medio que evalúa el efecto neurorestaurador de las CMMO como una opción de tratamiento para la enfermedad de Huntington. La posibilidad de utilizar este tipo de células en estos pacientes tiene como ventaja que proceden de la médula ósea, la que constituye una fuente de acceso fácil y brinda una alternativa a la utilización de células de origen neural. Esta investigación muestra el estudio más prolongado de la supervivencia de las CMMO trasplantadas descrito en la literatura unido a

resultados positivos en la evaluación de pruebas conductuales y morfológicas que se implementan por primera vez en el modelo de la enfermedad de Huntington.

Los resultados de este trabajo forman parte del proyecto de células madre del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN), el cual tiene como objetivo llevar esta terapia a pacientes con enfermedades neurológicas. Estos resultados han sido premiados como relevantes en el Fórum de Ciencia y Técnica (2013, 2014, y 2016). También han originado 4 publicaciones en revistas indexadas. Uno de estos artículos recibió el Premio Anual de Salud Nacional (Noviembre 2014).

Algunos de estos trabajos se consideran logros científicos del CIREN (2015 y 2016) y se presentaron en más de 10 eventos nacionales e internacionales relacionados con la temática de enfermedades neurodegenerativas.

Estructura del documento de tesis

La tesis cuenta con un total de 100 páginas de texto, distribuidas en los siguientes capítulos: CAPÍTULO I: Introducción (8 páginas); CAPÍTULO II: Revisión Bibliográfica (21 páginas); CAPÍTULO III: Materiales y Métodos (25 páginas); CAPÍTULO IV: Resultados (23 páginas); CAPÍTULO V: Discusión (17 páginas). Conclusiones (1 página), Recomendaciones (1 página). El documento también contiene la Síntesis, la Tabla de contenido, la Relación de abreviaturas y definición de términos, la Autobibliografía y la lista de Referencias Bibliográficas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante que fue descrita por George Huntington en 1872 (2). El comienzo de la enfermedad es lento, se sitúa en la edad media de la vida, habitualmente entre los 30 y 50 años de edad. Se manifiesta por la pérdida progresiva de las funciones cognitivas y movimientos musculares anormales, entre los cuales, el más frecuente pero no el único, es la corea, que se caracteriza por movimientos involuntarios con la aparición de muecas repentinas y movimiento exagerado de las extremidades (51). Los datos epidemiológicos de la enfermedad de Huntington se obtienen a través del estudio de familias afectadas, donde se demuestra el origen noreuropeo de la mutación, destacándose una densidad que va desde 2.5 a 9.95 por cada 100 000 habitantes lo que indica una prevalencia diferencial según la situación geográfica (52). Desde el punto de vista neuropatológico se caracteriza por muerte celular que afecta principalmente al estriado y la corteza cerebral. En la actividad neuroquímica del estriado de pacientes con esta enfermedad se detecta una disminución en la concentración de los neurotransmisores glutamato y del ácido- γ -amino butírico (GABA)(53-55). Desde el punto de vista molecular la enfermedad se distingue por una expansión del codón CAG en el primer exón, que codifica para una cadena de glutamina de la proteína huntingtina, cuya función se desconoce. La expansión de la poliglutamina representa una causa importante de la neurodegeneración, ya que resulta ser la responsable de las alteraciones observadas en otras siete enfermedades hereditarias, además de la enfermedad de Huntington (56).

Los síntomas iniciales se manifiestan con frecuencia por un cambio de la personalidad, pero los movimientos coreicos pueden ser el primer signo de la enfermedad (57). Los trastornos mentales iniciales a menudo son sutiles, aunque se pueden encontrar alteraciones de la conducta, irritabilidad, y tendencia al comportamiento agresivo o sexual no controlado (58-61). Es frecuente la depresión, y

el suicidio constituye un riesgo en estos pacientes. A medida que la enfermedad progresa, los movimientos coreicos son más intensos y grotescos. Con frecuencia aparece demencia que con el tiempo se vuelve más pronunciada (56;62;63). La marcha, el habla y el uso de las manos se hallan afectados. Igualmente, muchos pacientes experimentan rigidez y acinesia crecientes, que llevan a una reducción de la corea. Por último el paciente queda confinado en cama y caquéctico. La muerte se produce alrededor de los 15 y 20 años después del comienzo de la enfermedad (56).

En general los cuadros clínicos son muy variables incluyendo una variante clásica de inicio entre los 30 y 50 años, una variante senil, con inicio después de los 55 años y una variante juvenil con inicio antes de los 20 años (4).

Además de la triada de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos, hay otros síntomas importantes que han sido reconocidos en la enfermedad de Huntington, que incluyen los trastornos del sueño (64) y los circadianos (65) así como un número variable de manifestaciones periféricas relacionadas con la pérdida de peso (66) atrofia testicular (67) y alteraciones del sistema inmune (68-70)

II. Organización estructural y funcional de los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) constituyen un grupo de núcleos grises situados por debajo de la corteza y en la base de los hemisferios cerebrales (71). Actualmente se les considera un grupo de centros y circuitos interconectados anatómicamente y relacionados funcionalmente e incluyen: el cuerpo del *striatum* (caudado, putamen y accumbens), el *globus pallidum* (GP) [segmento lateral (GPl) y segmento medial (GPm)], el núcleo subtalámico (NST) y la *substantia nigra* [*pars reticulata* (SNr) y *pars compacta* (SNc)] (72;73).

Desde el punto de vista anatomofuncional, varios circuitos “corteza cerebral-GB-tálamo-corteza cerebral” han sido descritos. Estos circuitos funcionan en paralelo y desempeñan un papel importante

en las funciones somatomotoras, óculomotoras, cognitivas y límbicas, siendo cada uno de ellos el sustrato neural de funciones diferentes (74;75). Las conexiones cortico-estriado-pálido-tálamo-corticales que forman el circuito motor son las más relevantes en la fisiología del movimiento y en la fisiopatología de los trastornos motores. El circuito motor une áreas motoras precentrales y áreas sensitivas postcentrales, con la región sensitivo-motora del estriado (putamen dorsolateral), empleando glutamato como neurotransmisor y siendo, por tanto, una conexión excitadora (75).

El estriado, dentro de los GB, es considerado el núcleo integrador y principal receptor de las conexiones más importantes provenientes de las diferentes zonas de la corteza cerebral (74). Al mismo tiempo, el estriado recibe aferencias masivas provenientes del tálamo y menos abundantes provenientes del GP, NST, núcleo dorsal del rafe, *locus coeruleus*, porción basolateral de la amígdala y el núcleo pedúnculo pontino (NPP) (74).

Albin, Young y Penney en 1989 propusieron un modelo anatómofuncional, coherente de los GB, subdividido en vía “directa” e “indirecta”, partiendo de diferentes poblaciones neuronales estriatales y alcanzando los núcleos de salida (GPM y SNr) a través de una ruta diferente (76) (Fig. 1). Aunque el estado actual del conocimiento sobre el funcionamiento de los GB ha permitido profundizar en el papel que desempeñan las conexiones recíprocas entre núcleos como el GP y el NST, el modelo de funcionamiento propuesto por Albin, Young y Penney en 1989 se considera válido en la actualidad (76).

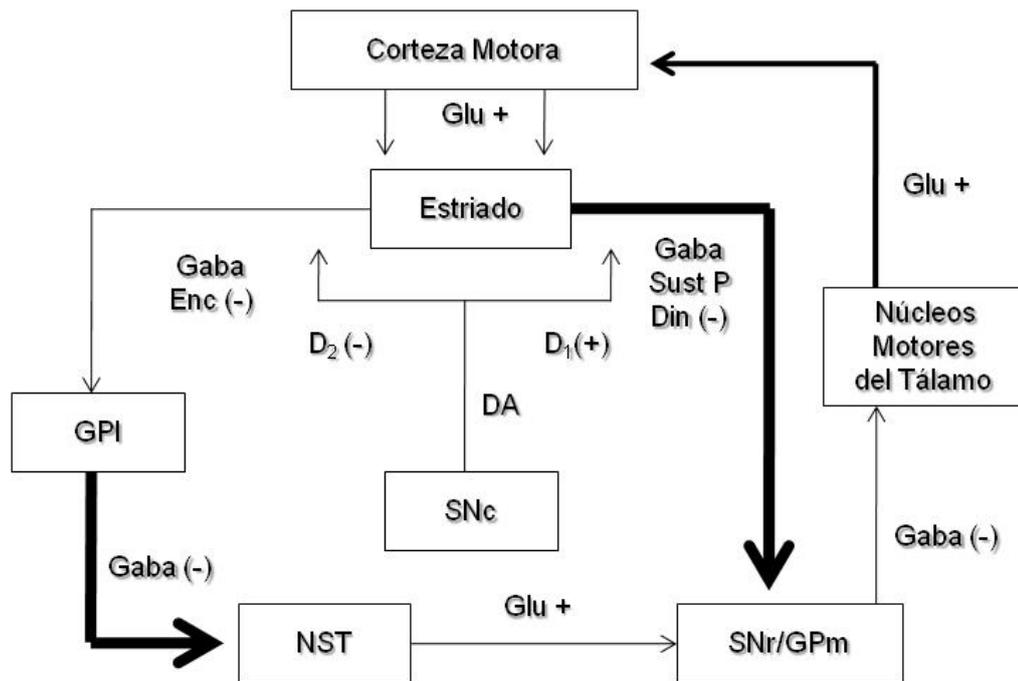


Figura 1. Diagrama del funcionamiento normal de los ganglios basales. Leyenda: (-) inhibitorio; (+) excitatorio; GPI: *globus pallidum lateral*; NST: núcleo subtalámico; GPm: *globus pallidum medial*; SNr: *substantia nigra reticulata*; SNc: *substantia nigra compacta*; Glu: glutamato; Gaba: ácido γ -amino butírico; DA: dopamina; Enc: encefalinas; Din: dinorfinas; Sust. P: sustancia P; D₁ y D₂: subtipos de receptores dopaminérgicos 1 y 2. El grosor de las flechas está en relación con la actividad de la conexión.

La vía “directa” es monosináptica y tiene su origen en neuronas gabaérgicas inhibitorias que coexpresan sustancia P y dinorfina, presentan receptores dopaminérgicos D₁ y proyectan sobre la región sensitivo-motora del GPm y la SNr (75;77;78)(Fig.1). La vía “indirecta” por su parte, es polisináptica, se origina en las neuronas estriales gabaérgicas que coexpresan encefalina, presenta receptores dopaminérgicos D₂ y proyecta al GPI (Fig. 1). El GPI envía eferencias gabaérgicas a la región sensitivomotora del NST, que a su vez proyecta al GPm y a la SNr, empleando glutamato como neurotransmisor y por tanto excitando la salida de los GB (77).

Las eferencias del GPm y la SNr son gabaérgicas y proyectan a los núcleos motores del tálamo (núcleos ventral anterior y ventral lateral), en ruta hacia la corteza y núcleos troncoencefálicos. Las eferencias tálamo-corticales glutamatérgicas, proyectan sobre las zonas motoras de corteza y cierran el circuito (79).

Este modelo sugiere que la activación de la vía corticoestriatal produce (a partir de la “vía directa”): inhibición gabaérgica de las neuronas del GPM y la SNr, desinhibición de los núcleos talámicos diana y facilitación de las proyecciones talámicas a las áreas motoras precentrales. El efecto neto de esa secuencia sería una retroalimentación positiva de los movimientos iniciados en la corteza (77).

Por su parte, en las neuronas gabaérgicas de la “vía indirecta”, la estimulación corticoestriatal produce: inhibición del GPI, desinhibición del NST, excitación del GPM y la SNr que aumenta su actividad eferente inhibitoria sobre sus dianas talámicas y troncoencefálicas junto a la reducción de la facilitación de la vía tálamo-corteza motora. El efecto neto de esta secuencia sería una retroalimentación negativa de los movimientos, que podría ser funcionalmente interpretado como una inhibición de las contracciones musculares inadecuadas al movimiento en marcha, o una señal de detención del movimiento (77;78).

Aunque, sin lugar a dudas y a grandes rasgos, el modelo de funcionamiento inicialmente descrito aún es válido, desde su descripción hasta la actualidad ha aumentado la comprensión del funcionamiento de los ganglios basales en estado normal y patológico. Por un lado, el concepto de funcionamiento en circuitos paralelos ha sido ampliamente confirmado en humanos a través de estudios de resonancia magnética funcional y de tomografía por emisión de positrones (80). Mientras, el concepto original de la vía "indirecta" ha sido ampliamente revisado; el núcleo subtalámico ya no sólo se considera una estructura de relevo, intermedia entre el GPI y el GPM, dentro de esta vía; si no se considera otra estación de entrada de los GB que recibe aferencias de la corteza cerebral y de otras estructuras (81). La relevancia de estas conexiones ha permitido describir, además de la vía “directa” e “indirecta” una vía “hiperdirecta” dentro de los subcircuitos que unen la corteza cerebral y los núcleos de salida de los GB. Esta vía “hiperdirecta” es, al igual que las anteriormente descritas de origen cortical, la descarga cortico-subtalámica incrementa la excitación de neuronas del GPM y de la sustancia negra reticulada vecinas, por lo que inhiben la región correspondiente del tálamo y con ello la selección de movimientos no deseados

(82;83).

Consecuentemente, en la actualidad el énfasis en la comprensión del funcionamiento normal de los GB está focalizado sobre las interacciones paralelas entre las aferencias cortico-estriatales y cortico-subtalámicas por un lado y los circuitos de retroalimentación que modulan la actividad cortical a través de los núcleos de salida. Basado en que en los últimos años se han descrito varios lazos transversales, la mayoría de ellos con un posible papel modulador.

En resumen, el aspecto fundamental de la fisiología de los GB con énfasis en el circuito motor, consiste en que la inhibición en los núcleos de salida (GPm/SNr) conduce a una facilitación del movimiento, mientras que el aumento en las descargas neuronales de estos provoca detención o inhibición del mismo (76;79;84). Una señal cortical evocará una secuencia temporal de excitación o inhibición en las neuronas de la SNr y el GPm y la alteración de este patrón de señal puede conducir a trastornos del movimiento (84).

III. Alteraciones en el funcionamiento de los GB en la enfermedad de Huntington

En la enfermedad de Huntington el estriado es la estructura mayormente afectada, en particular las neuronas espinosas de mediano tamaño y como ya se ha planteado, es el núcleo integrador y principal receptor de las conexiones más importantes provenientes de la corteza cerebral (74;77). Está formado por diferentes tipos de células neurales, pero las neuronas espinosas de mediano tamaño, que utilizan como neurotransmisor el GABA representan del 90-95% de las neuronas encontradas y son sus principales células de proyección (85). El resto de los tipos neuronales del estriado son menos frecuentes e incluyen neuronas con dendritas largas que utilizan como neurotransmisor la acetilcolina y que funcionan como interneuronas.

La degeneración de las células gabaérgicas de talla mediana del estriado provoca la pérdida de la influencia del neurotransmisor GABA sobre sus blancos, afectándose de manera diferente la transmisión a través de las vías “directa” e “indirecta” del circuito motor (78;86;87).

La transmisión sináptica a través de la vía “directa” (estriado-GPm/SNr) está disminuida, por lo cual debido a su naturaleza gabaérgica, los potenciales postsinápticos inhibitorios que esta vía genera en las neuronas de los núcleos eferentes, GP y SNr están disminuidos (77). Al perderse la acción inhibitoria de estas neuronas espinosas sobre estos núcleos, ellos podrían ejercer la suya libremente sobre el tálamo. Se presupone que este mecanismo conduciría así a la bradicinesia, que se observa en algunos casos de enfermedad de Huntington en etapas tardías (Fig.2A) (88;89).

En la transmisión sináptica a través de la vía “indirecta” (estriado-GPI-NST-GPm/SNr) está disminuida la actividad gabaérgica del estriado sobre el GPI (74;90), lo cual provoca que este núcleo inhiba libremente al NST (74;78) (Fig. 2B). Esto produce una falta de estimulación glutamatérgica del NST sobre el GPI y la SNr, quedando el tálamo libre de esta influencia inhibitoria, apareciendo entonces la corea (91-93).

En la Figura 2 se muestra el estado funcional de la vía “directa” y vía “indirecta” en la Enfermedad de Huntington.

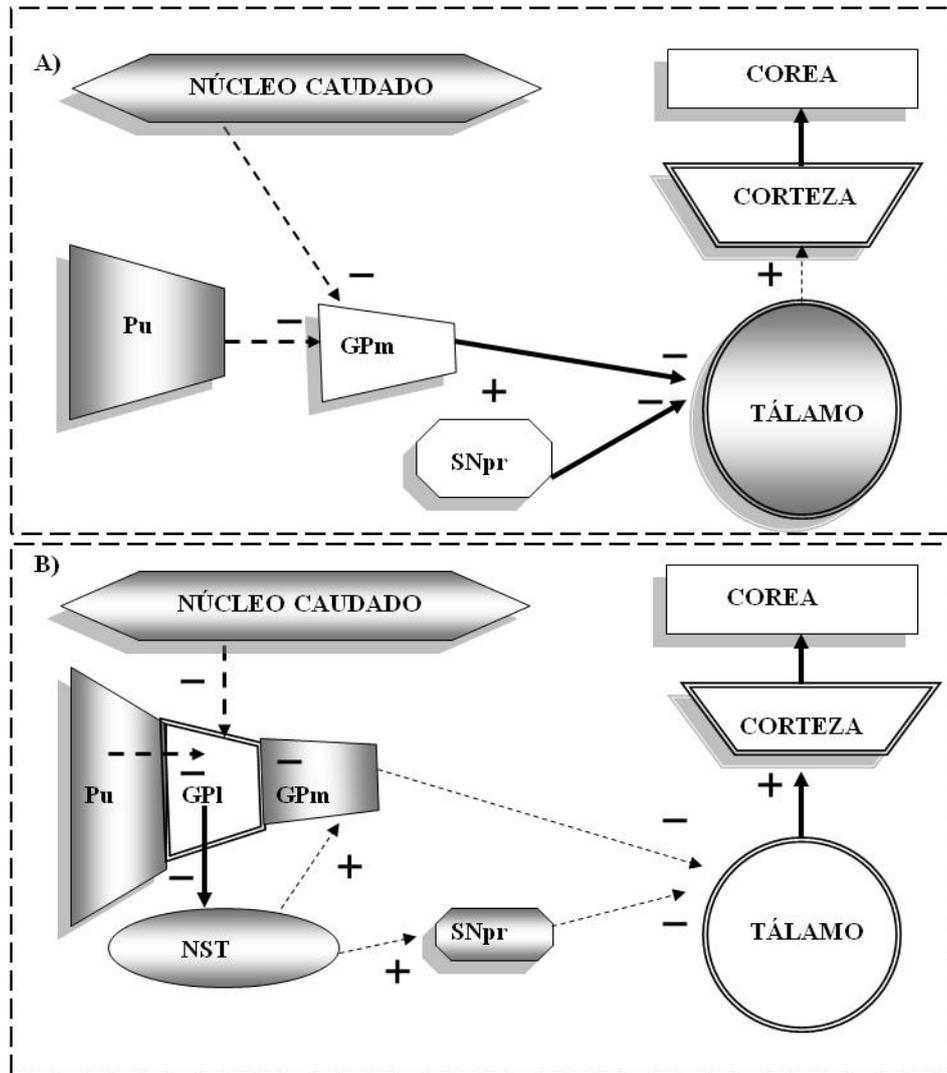


Figura 2. A) Vía directa y B) Vía indirecta en la enfermedad de Huntington. Contorno simple-área con trama: núcleo inhibido. Contorno doble-sin trama: núcleo activo; Línea continua: vía activa; Línea discontinua: vía inactiva; Pu: putamen; NST: núcleo subtalámico; SNr: *substantia nigra reticulata*; GPl: Globo pálido lateral; GPm: Globo pálido medial; Pu: Putamen; (-) acción inhibitoria; (+) acción excitatoria.

IV. Bases moleculares y patogénicas de la enfermedad de Huntington

En el año 1993 el grupo de investigación colaborativo de la enfermedad de Huntington descubrió el origen genético de la enfermedad la cual es autosómica dominante con penetrancia completa, encontrándose asociada a una repetición del triplete de nucleótidos CAG en la región que codifica el

gen de la huntingtina (6). En la población sana los trinucleótidos de CAG se encuentran en un número menor de 30 repeticiones. En el caso de los enfermos, existe un número de repeticiones mayor de 36 llegando a ser en algunos casos superiores a 100 (94;95). Esta alteración consiste en la inserción de múltiples copias de dicho trinucleótido en diferentes regiones de un gen localizado en el brazo corto del cuarto par de cromosomas, específicamente en el gen IT15, que es el encargado de codificar la huntingtina que se expresa no sólo en el cerebro sino también en diferentes tejidos. Debido a la mutación genética, en los pacientes con la enfermedad de Huntington la huntingtina es sintetizada con un exceso de glutamina, lo cual contribuye a que la misma se agregue formando complejos insolubles con la ubiquitina y otras proteínas fibrilares, apareciendo de manera característica, como cuerpos de inclusión en el núcleo de las células (94;95). Aunque no se conoce la acción que ejerce la huntingtina se plantea que su unión a estas proteínas pudiera estar asociada con la transmisión de señales neuronales y la regulación de la muerte neuronal apoptótica (96). Se ha reportado que el depósito de la huntingtina mutada provoca en las etapas tempranas de la enfermedad, la muerte de las neuronas de proyección gabaérgicas espinosas de mediano tamaño que expresan encefalinas y se localizan en el estriado (97).

El descubrimiento de la huntingtina ha abierto una nueva perspectiva en la patogenia y tratamiento de la enfermedad de Huntington, aunque se desconocen los mecanismos responsables de la muerte celular selectiva (6).

Los principales hallazgos neuropatológicos de la enfermedad de Huntington se encuentran localizados en el estriado, donde se ha evidenciado una pérdida de las neuronas de proyección, unido a una preservación de las interneuronas espinosas grandes (97-99).

La patogenia de la enfermedad de Huntington se explica por diversos mecanismos: excitotóxicos, metabólicos y de estrés oxidativo (100;101).

El daño excitotóxico es producido por la hiperactividad local de aminoácidos excitatorios sobre sus receptores, lo cual conduce a una despolarización sostenida que provoca la muerte celular selectiva. El glutamato u otros aminoácidos excitatorios endógenos que actúan sobre varios tipos de receptores glutamatérgicos pudieran estar involucrados en la patogenia de la enfermedad de Huntington (102;103). Los receptores glutamatérgicos son de dos tipos: metabotrópicos e ionotrópicos, los metabotrópicos son aquellos que se encuentran ligados a la proteína G e incluyen el ácido L-2-amino-4-fosforopropiónico (104) y los ionotrópicos se encuentran ligados a canales iónicos e incluyen a los de N-metil-D-aspartato (NMDA), los kaínato y los ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico (AMPA). Aunque todos pueden mediar la muerte celular, desencadenada por mecanismos citotóxicos, tanto apoptótica como necrótica, los receptores NMDA son los que tienen la acción más relevante, y los que se encuentran más ampliamente distribuidos en el cerebro (105).

La neurotoxicidad por aminoácidos excitatorios no depende solamente de los niveles endógenos de los posibles compuestos neurotóxicos, ni del grado de eficacia de sus mecanismos de recaptación; sino de otros factores que modulan la respuesta, y por tanto la actividad neuronal a nivel del receptor o de la propia neurona post-sináptica. A nivel del receptor se han descrito compuestos endógenos que inhiben de forma competitiva el receptor NMDA y sustancias que lo modifican alostéricamente aumentando la afinidad del mismo por su ligando (106;107). A nivel de la neurona post-sináptica, el efecto de los aminoácidos excitatorios puede ser modificado por manipulaciones de los canales iónicos, segundos mediadores, activadores o inhibidores de las proteínas quinasas, factores de crecimiento y otros fármacos (108).

Estudios en cultivo de tejido indican que la muerte neuronal mediada por los receptores glutamatérgicos, puede seguir dos vías diferentes: una forma aguda y una retardada (109). La neurotoxicidad aguda se caracteriza por una dilatación de la célula en presencia de agonistas glutamatérgicos, que trae como consecuencia la lisis osmótica de la neurona (necrosis). Los dos

iones responsables de la entrada masiva de agua son el Na⁺ y el Cl⁻. La degeneración neuronal retardada es mediada por mecanismos dependientes de Ca²⁺. Este puede mediar la muerte celular por varios mecanismos que incluyen activación de proteína quinasas, fosfolipasas A₂, óxido nítrico sintetasa, proteasas, generación de radicales libres, daño mitocondrial e inhibición de la síntesis de proteínas (110;111). La inyección intraestriatal de agonistas de los receptores glutamatérgicos reproduce numerosas de las características neuroquímicas y neuropatológicas de la enfermedad de Huntington.

Con relación a los mecanismos metabólicos planteados en la patogenia de la enfermedad de Huntington, existe una hipótesis en la que se aúnan el conocimiento de los mecanismos excitotóxicos mediados por los receptores NMDA con los defectos en el metabolismo energético detectados en la enfermedad de Huntington (112). Según esta hipótesis los mecanismos excitatorios contribuirían a la muerte neuronal de las células con dificultades metabólicas.

En la enfermedad de Huntington se produce un déficit del 55 % en la actividad de los complejos mitocondriales II y III y de un 25 % del complejo IV, en el caudado y el putamen (113). El déficit enzimático que afecta a la cadena respiratoria, atañe de manera importante al metabolismo celular, limitando el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato, que pasa a ser metabolizado a lactato y así se reduce la producción de ATP (114). Por otro lado, estudios de SPECT muestran que en la enfermedad de Huntington tiene lugar una disminución de la perfusión sanguínea cerebral, detectada incluso en portadores presintomáticos de la mutación. Estudios realizados con tomografía por emisión de positrones de F-18 fluorodeoxiglucosa (FDG-PET) en pacientes con la enfermedad de Huntington y portadores presintomáticos revelan la disminución del patrón típico de la actividad metabólica cerebral en los núcleos de la base, correlacionada con el grado de disfunción motora, así como en los lóbulos frontales y parietales (115).

Finalmente existe otro mecanismo relacionado con el estrés oxidativo, el cual plantea que la cadena

respiratoria mitocondrial genera radicales libres que alteran la función celular normal. El óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintetasa, se ha detectado en las interneuronas no espinosas de talla media a grande del estriado, donde actúa como neurotransmisor. Además puede generar radicales hidroxilos a partir del anión superóxido (116;117).

V. Modelos experimentales en la enfermedad de Huntington

Los estudios realizados para aumentar el conocimiento sobre los aspectos básicos de la enfermedad de Huntington, conjuntamente con la constante búsqueda de alternativas terapéuticas para la enfermedad, ha hecho incuestionable la importancia del uso de la experimentación animal. Aunque la enfermedad de Huntington no se manifiesta en los animales de manera espontánea, se han desarrollado modelos experimentales que han ayudado a estudiar los mecanismos involucrados en la patogenia de la misma, permitiendo desarrollar estrategias terapéuticas. No existe un modelo experimental único que satisfaga completamente los requerimientos de similitud con la enfermedad en cuanto a fenomenología clínica, aspecto histológico y genético. Sin embargo, se sabe desde hace más de dos décadas, que la inyección intracerebral de algunas neurotoxinas producen lesiones estriatales que remedan las lesiones histológicas observadas en la enfermedad de Huntington (118).

En general se han descrito dos tipos de modelos homólogos para la enfermedad de Huntington: tóxicos y genéticos.

MODELOS TOXICOS

La muerte neuronal excitotóxica se produce como consecuencia de un defecto en el metabolismo oxidativo. Las interrupciones en la síntesis de ATP conducen a una despolarización neuronal parcial con la activación de receptores NMDA, lo que provoca un daño neuronal excitotóxico secundario (119).

Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington basados en la excitotoxicidad

Los mecanismos de excitotoxicidad están basados en la sobreexcitación de las neuronas como resultado de la estimulación propagada y continua de los receptores a aminoácidos excitadores, lo que produce serias alteraciones en la fisiología de las neuronas, conduciéndolas a la muerte celular (120;121).

Las toxinas con las que se producen estos modelos de excitotoxicidad son las siguientes:

Ácido kaínico: Es un derivado de las algas y es un agonista del receptor kaínato (122) En 1976 Coyle estableció el empleo de ácido kaínico para reproducir las características histológicas, conductuales y bioquímicas de la enfermedad de Huntington, produciendo una lesión de las neuronas gabaérgicas y colinérgicas sin alterar a las neuronas dopaminérgicas. La actividad de algunas enzimas como la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y la colina acetil transferasa (ChAT) disminuyeron de forma similar a lo encontrado en la enfermedad. Sin embargo, a diferencia de la enfermedad de Huntington, se observó una disminución significativa en los niveles de la somatostatina y el neuropéptido Y (123)

Ácido Iboténico: Es un análogo rígido del glutamato (124). En 1990, Hantraye propuso al ácido iboténico como inductor de un modelo experimental de la enfermedad de Huntington, basado en la toxicidad de este ácido en el hipocampo de la rata. Cuando se administró en el cuerpo estriado de bovinos, se observó una proliferación astrocítica y pérdida de fibras colinérgicas sin alteración de las fibras dopaminérgicas. Hubo disminución de metaencefalinas acompañándose de alteraciones conductuales tales como: corea, distonía y asimetría postural. No obstante, también se observaron diferencias conductuales que limitan la reproducibilidad del modelo, siendo mejor alternativa que el del ácido kaínico, pero con ciertas limitaciones (125).

Ácido Quinolínico: Es derivado del metabolismo del ácido kinurénico (que proviene de una rama del metabolismo del triptófano), reproduce en parte los cambios bioquímicos y neuropatológicos de la enfermedad de Huntington, lo que demuestra que el ácido quinolínico es capaz de inducir lesiones neuronales cuya distribución es mucho más parecida a la que produce el ácido kaínico en el modelo de enfermedad de Huntington, ya que afecta a las neuronas espinosas conservando relativamente a las no espinosas. Entre los cambios más significativos desde el punto de vista neuroquímico se destacan la reducción severa de las concentraciones de GABA en células estriatales, disminución de la actividad GAD y gliosis estriatal (126).

Se ha demostrado que después de la administración de ácido quinolínico en el estriado, se producen niveles de somatostatina, neuropéptido Y, sustancia P, vasopresina, GABA y dopamina muy similares a los que se observan en la enfermedad de Huntington por lo que se considera como el mejor modelo experimental. Esto se debe a que el ácido quinolínico es un metabolito del L-triptófano que se produce de manera natural en el tejido cerebral (126;127). En la Tabla 1 se indican los principales cambios de estas sustancias neuroactivas en la enfermedad de Huntington y en los diferentes modelos experimentales de la enfermedad.

Tabla 1. Cambios en las sustancias y neurotransmisores producidos en la enfermedad de Huntington y por la administración de diferentes neurotoxinas en la rata.

Sustancia neuroactiva	EH	AK / IBO	AQ
GABA	↓	↓	↓
Acetilcolina	↓	↓	↓
Sustancia P	↓	↓	↓
Dopamina	NC	NC	NC
Somatostatina	↑	↓	NC
Neuropéptido Y	↑	↓	NC

NC: no cambia; ↓: disminuye; ↑: aumenta; GABA: ácido- γ -amino butírico; AK: ácido kaínico; IBO: ácido iboténico; AQ: ácido quinolínico.

Desde el punto de vista conductual, el ácido quinolínico produce hiperactividad locomotora y alteraciones del aprendizaje y la memoria. Con este conocimiento, se llegó a proponer al ácido

quinolínico como el principal agente etiológico en la enfermedad de Huntington, y que las lesiones provocadas por concentraciones submicromolares de esta toxina pueden ser bloqueadas por el MK-801, un antagonista no competitivo de los receptores para NMDA lo que sugiere que las alteraciones observadas en los enfermos, están mediadas por la excitación de estos receptores (128).

En la Figura 3 se muestra un esquema del mecanismo de acción excitotóxico del ácido quinolínico.

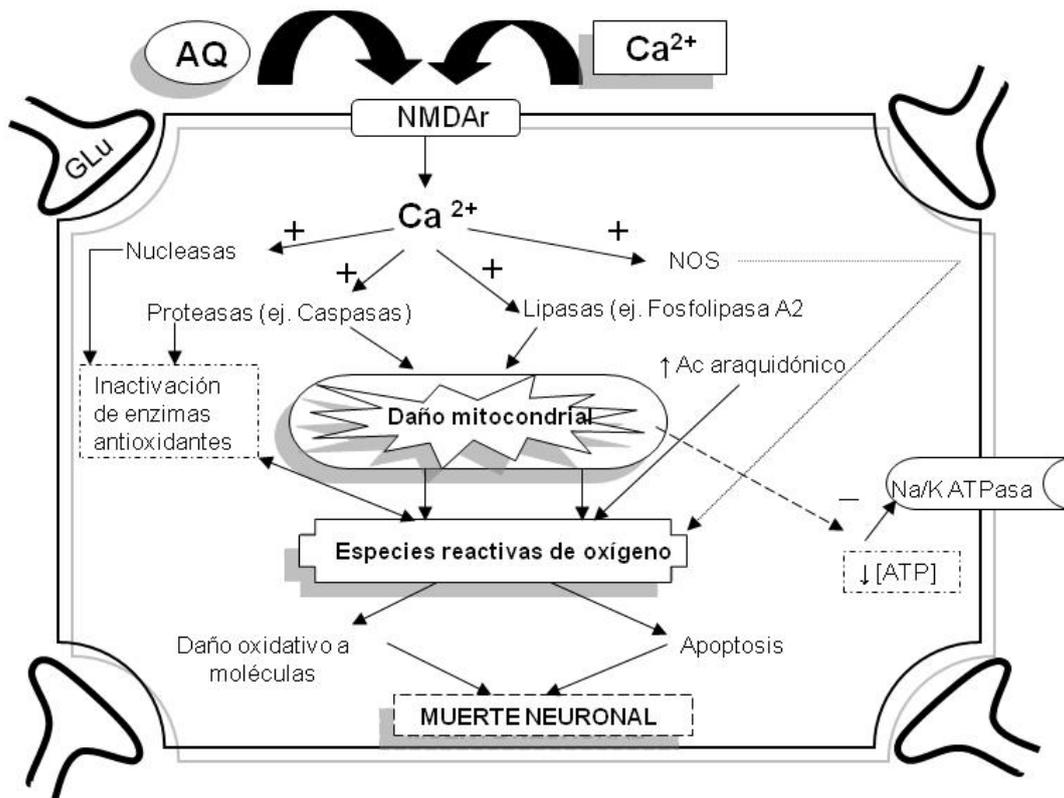


Figura 3. Diagrama del mecanismo de acción excitotóxico del ácido quinolínico (AQ) sobre una neurona gabaérgica estriatal. La entrada masiva de calcio a la célula a través del receptor NMDA persistentemente activo provoca la activación de enzimas líticas y de la óxido nítrico sintasa (NOS). El daño mitocondrial consecuente es uno de los factores para el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte neuronal debida al daño a las biomoléculas y a la activación de programas apoptóticos. El déficit energético contribuye a la perpetuación del proceso degenerativo por favorecer la despolarización de la membrana y así mantener el estado activo del receptor NMDA. Esto hace a la célula sensible a la aferencia glutamatérgica normal procedente de la corteza cerebral.

Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington basados en la alteración del metabolismo energético

La teoría de la excitotoxicidad explica el mecanismo de muerte neuronal en la enfermedad de Huntington y en otras enfermedades neurodegenerativas como una primera causa de muerte neuronal, pero una posible explicación de la toxicidad del glutamato podría ser también el déficit en la producción de energía mitocondrial (129-131). Por lo tanto se hipotetizó que las alteraciones en la fosforilación oxidativa pueden ser el déficit primario que predispone a la degeneración neuronal secundaria a la toxicidad por glutamato (132).

La toxina con la que se produce este tipo de alteración metabólica es el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (inhibidor del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial). El mecanismo de daño de esta toxina es la inhibición de la succinato deshidrogenasa, enzima que juega un papel central en la cadena de transporte de electrones y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La administración sistémica de dosis bajas de ácido 3-NP produce atrofia estriatal selectiva (133). Se cree que el daño selectivo causado por el 3-NP en ciertas regiones del cerebro está directamente relacionado con la tasa metabólica y la densidad de receptores a NMDA de cada región (134).

El modelo del ácido 3-NP constituye una alternativa para producir lesiones similares a las de la enfermedad de Huntington, ya que induce una inhibición irreversible del ciclo del ácido cítrico mitocondrial que produce una disminución del ATP y una elevación de las concentraciones de lactato (132;135). Además se han encontrado niveles bajos de glutamato y daño en el metabolismo energético oxidativo como los observados en pacientes con desórdenes neurodegenerativos incluyendo la enfermedad de Huntington (135;136).

Este modelo se ha combinado con el de excitotoxicidad pues se sabe que el efecto neurotóxico del ácido 3-NP es potenciado por agonistas NMDA y disminuido por el pretratamiento con antagonistas de este subtipo de receptor glutamatérgico.

MODELOS GENÉTICOS

Modelos experimentales basados en el defecto genético de la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es causada por una mutación dominante en un gen simple. Teóricamente, la generación de modelos que portan el gen defectuoso es relativamente fácil. Sin embargo, la práctica ofrece varios modelos para complementar el estudio de este aspecto de la enfermedad. Se incluyen los modelos en invertebrados (*Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*) (137;138); roedores (de fragmento N-terminal truncado, Knock-in y transgénicos) (139-141); ovejas (142;143), cerdos (144); y en primates no humanos (145).

Estos modelos han llegado a ser una herramienta de rutina en muchos campos de la ciencia biomédica, ya que se puede realizar una amplia variedad de experimentos en un tiempo más corto (146). Diferentes especies de animales se utilizan con este fin. Algunos de ellos satisfacen mejor ciertos aspectos de la enfermedad de Huntington para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, las alteraciones en la marcha se evalúan en roedores y en un gran número de animales a pesar del hecho de que son cuadrúpedos, porque la mayoría de los sistemas de control motor se sobrelapan en los mamíferos. Sin embargo, tales medidas no son relevantes en modelos de mosca de la enfermedad de Huntington. En contraste estos modelos de mosca pueden ser recomendados para estudios farmacológicos u otros procesos celulares, pero como ellos no expresan todos los genes del genoma humano su utilidad siempre será limitada (147;148). Un aspecto que se destaca con el uso de modelos genéticos en roedores es su vida relativamente corta en comparación con la de los humanos, lo que limita su uso en estudios dependientes de la edad, así como la presencia de un cerebro pequeño que limita los estudios imagenológicos. A pesar de estas dificultades la investigación continúa, y otros modelos muestran ser excelentes en ovejas y cerdos (149). Ambos modelos ofrecen una oportunidad única para el entendimiento de la relación de la mutación genética y el declinar neurológico en los pacientes con la enfermedad de Huntington ya que tienen más similitud con el

cerebro humano en términos de anatomía, tiempo de vida y genética, sin contar su ventaja sobre los primates no humanos por razones económicas (149), que por otro lado se encuentran aún en desarrollo.

VI. Fármaco terapéutica actual en la enfermedad de Huntington

No existe tratamiento curativo para estos enfermos. Hasta la fecha todos los tratamientos establecidos se limitan a la mejoría de los síntomas que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad. Un gran número de medicamentos como la deutetrabenazina y la privopidina (150-152) sirven para tratar las alteraciones del movimiento y trastornos psicológicos que se asocian a esta entidad tales como: la corea, la psicosis y la depresión. A pesar de que la mayoría de estos medicamentos son útiles en el manejo de la enfermedad de Huntington, no existe aún ninguno que detenga o revierta el proceso ya establecido. Estos fármacos se administran en dosis crecientes hasta que se controla la corea. También ayudan a controlar las complicaciones mentales, que con frecuencia son muy angustiantes para los enfermos (153).

VII. Tratamientos potenciales para la enfermedad de Huntington

Terapia Neuroprotectora

La neuroprotección ha sido uno de los pilares explorados en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, ya que conociendo el requerimiento trófico específico de la población neuronal afectada, se puede inducir una respuesta trófica endógena o una administración exógena de factores neurotróficos que ayudan a prevenir o detener la progresión de la enfermedad (154;155). Así se comprueba que las células que expresan factores neurotróficos permiten una diferenciación y supervivencia más eficaz del trasplante con una incidencia positiva sobre las funciones motoras en los modelos experimentales en los que se utilizan (156-158).

Terapia génica

La enfermedad de Huntington es una de las nueve enfermedades neurodegenerativas que resulta de una expansión de poliglutamina repetida, que adquiere una función tóxica (6) por lo que en esta entidad la terapia génica cobra gran importancia. En el presente se describen terapias en la que los animales se tratan con sustancias que incrementan la transcripción de genes neuroprotectores (159) que previenen de la muerte por apoptosis (160) o que inhiben la formación de agregados de poliglutamina (161;162) entre otros. Todas estas terapias afectan de manera indirecta la expresión de alelos en la enfermedad de Huntington. Sin embargo, hasta la fecha no existen terapias que provoquen la reducción directa de la expresión del gen mutado que aparece en la enfermedad. Hoy día se conoce que la terapia que utiliza el silenciamiento de la expresión de genes mutados tiene valor terapéutico en la enfermedad de Huntington. Este aspecto se demuestra en modelos experimentales en los que se silencian genes mutados responsables de las características neuropatológicas y motoras que se observan en la enfermedad (163). Los resultados obtenidos sirven de sustento para terapias que utilizan el ARN interferente (164-167).

Trasplante de células

Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha levantado en los últimos años es la terapia celular con células madre. El aislamiento de células embrionarias humanas, y la aparente e inesperada potencialidad de las células madre adultas nos lleva a imaginar un futuro esperanzador para un número importante de enfermedades incurables actualmente.

Los resultados en la experimentación animal durante aproximadamente más de 20 años con la ausencia de una farmacoterapia efectiva, inició la investigación clínica del trasplante de células. En 1994 se crea el grupo "European Network for striatal Transplantation in Huntington's Disease" (Equivalente al grupo NECTAR para el trasplante en los pacientes con enfermedad de Parkinson),

para el trasplante estriatal en pacientes con la enfermedad de Huntington, y paralelo a esto se desarrolló una prueba de evaluación para dichos pacientes previo a recibir el trasplante (168).

1. Trasplante de células neurales

En la década de 1980 hubo un incremento en las terapias dirigidas a contrarrestar las alteraciones presentes en etapas tempranas de la enfermedad de Huntington, incluido el uso del trasplante de tejido neural fetal como un método terapéutico (169;170). El primer trasplante neural en pacientes con enfermedad de Huntington fue realizado por Madrazo en 1990 (171). Sramka en 1991 practicó esta terapia en modelos experimentales en la República Checa (172;173). Posteriormente esta técnica novedosa se mantuvo detenida, para utilizarse nuevamente en pacientes en el año 1996 (174). Este programa de trasplante neural fue iniciado y seguido por otros países como por ejemplo Francia (175;176) y los Estados Unidos (177) donde fueron tratados varios pacientes. Los resultados en estos estudios indicaron una mejoría funcional, motora y cognitiva con un impacto positivo en las actividades de la vida diaria de estos pacientes (176;178)

La consolidación del trasplante celular como tratamiento alternativo en la enfermedad de Huntington tiene como premisa la existencia de una fuente segura de obtención de células. En este momento el trabajo con las células neurales fetales tiene importantes problemas técnicos y éticos que limitan su obtención. Por esta razón la comunidad científica está enfrascada en la búsqueda de fuentes alternativas de células para el trasplante, como las del estriado fetal porcino (179) y las células encapsuladas por ingeniería genética para secretar factores tróficos (180).

Se conoce que resulta muy beneficioso el hecho de poder generar *in vitro* tejido neural humano. En los momentos actuales se establece que las células madre embrionarias de blastocitos de ratón se expanden en cultivo y por tanto se logra que se diferencien en un amplio rango de tejidos, incluyendo las células neurales y gliales. En otros estudios se obtienen células madre neurales que son aisladas

tanto de cerebro de roedores adultos como de aquellos que se encuentran en desarrollo (181-183).

Se ha determinado que las fuentes celulares no neurales tienen un alto potencial para el trasplante en enfermedades del sistema nervioso. Esas células pueden ser útiles en el trasplante autólogo, tanto en terapia génica como celular (184).

2. Trasplante de células no neurales

Existen diversas fuentes de células no neurales que se utilizan en el trasplante, como son las células de médula ósea, adiposas y de sangre de cordón umbilical (185-188). Por su importancia en este estudio nos centraremos en las células de médula ósea.

Potencialidades de las células de médula ósea como una fuente alternativa para el trasplante en pacientes con enfermedades neurológicas

La médula ósea adulta es de muy fácil acceso y es una fuente rica de células progenitoras y de células madre (189). Las publicaciones actuales muestran que las células madre de médula ósea son capaces de generar un fenotipo neural tanto *in vitro* (190) como *in vivo* después del trasplante (45;191). Las células aisladas de médula ósea se utilizan de manera exitosa para el trasplante en modelos experimentales de trauma craneo encefálico (192;193) así como en la isquemia estriatal para reducir el déficit motor que aparece después del daño (194). Recientemente, se ha utilizado el trasplante de células madre de médula ósea autóloga para revertir el déficit cognitivo observado en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington, donde se demuestra que el trasplante de células de médula ósea es capaz de reducir el daño cognitivo que aparece en este modelo (195). Estos resultados son prometedores, porque el uso de células madre adultas autólogas minimiza el riesgo de rechazo inmunológico y al mismo tiempo evita los problemas éticos que existen con el uso de trasplante de tejido fetal como alternativa terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 4 muestra el esquema del diseño experimental por etapas para cada ensayo.

Diseño Experimental

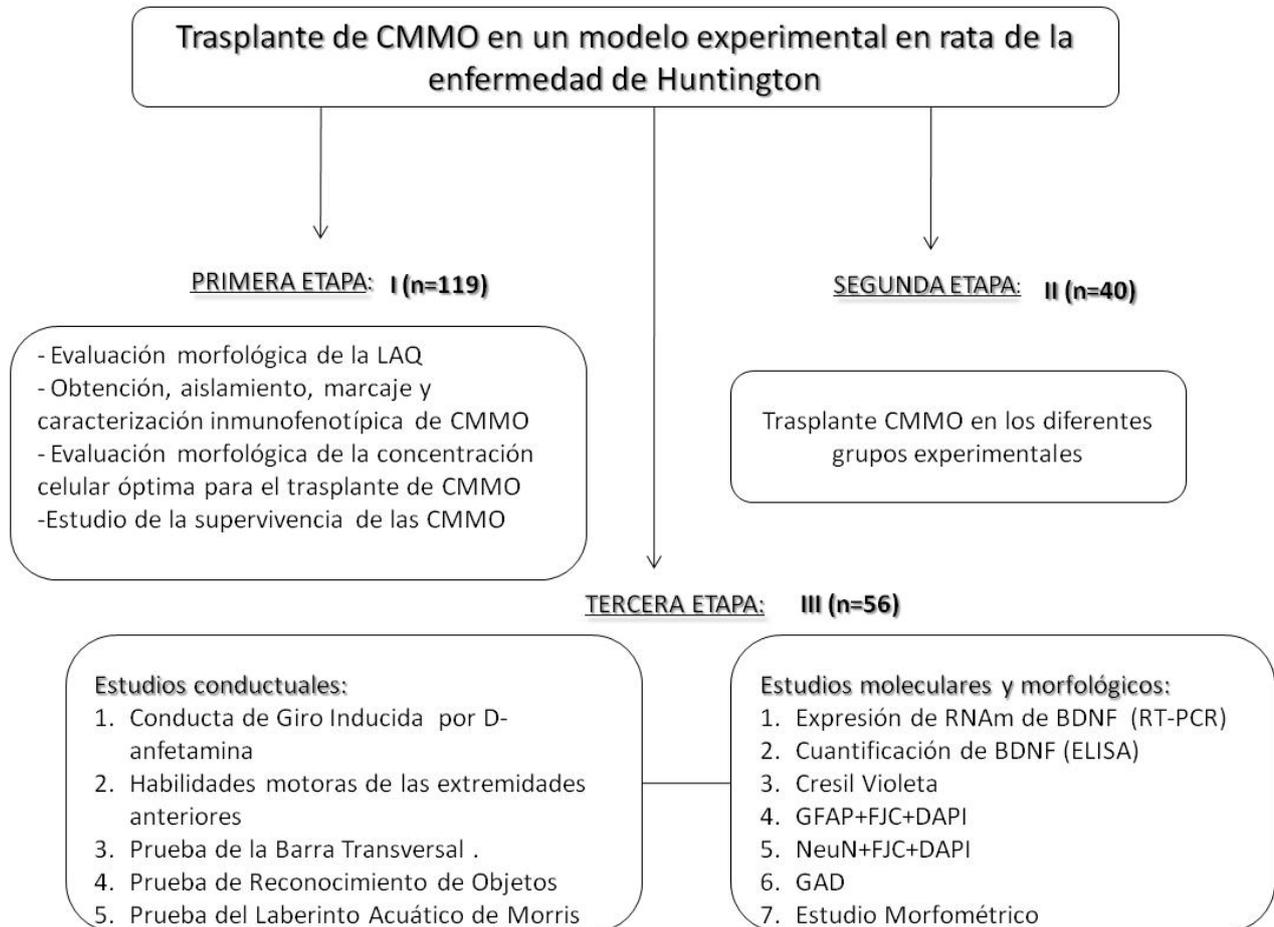


Figura 4. Diseño experimental. Los números romanos sobre los cuadrantes representan los experimentos realizados correspondientes a los objetivos con el número total de animales utilizados. Los experimentos incluidos en la primera etapa permitieron la implementación del modelo de la enfermedad de Huntington. El experimento realizado en la segunda etapa permitió el trasplante de CMMO y/o DMEM en los grupos experimentales con las condiciones óptimas; mientras que los experimentos incluidos en la tercera etapa evaluaron el efecto restaurador que sobre la conducta y la morfología tiene el trasplante de CMMO en el sujeto experimental. LAQ: Lesión con ácido quinolínico; CMMO: células mononucleares de médula ósea; ; BDNF: Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (de sus siglas en inglés: Brain Derived Neurotrophic Factor); ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (de sus siglas en inglés: Enzyme linked Immunoabsorbent Assay); RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (de sus siglas en inglés: Reverse transcription polymerase chain reaction); GFAP: proteína ácida fibrilar de la glía (de sus siglas en inglés: Glial Fibrillar Acid Protein); NeuN: Marcador neuronal nuclear; FJC: Fluoro jade-C; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenylindole; GAD: descarboxilasa del ácido glutámico.

La Figura 5 muestra el diagrama temporal del diseño experimental: lesión, trasplante, pruebas conductuales, estudios morfológicos, moleculares, y de supervivencia celular.

Diagrama temporal del diseño experimental

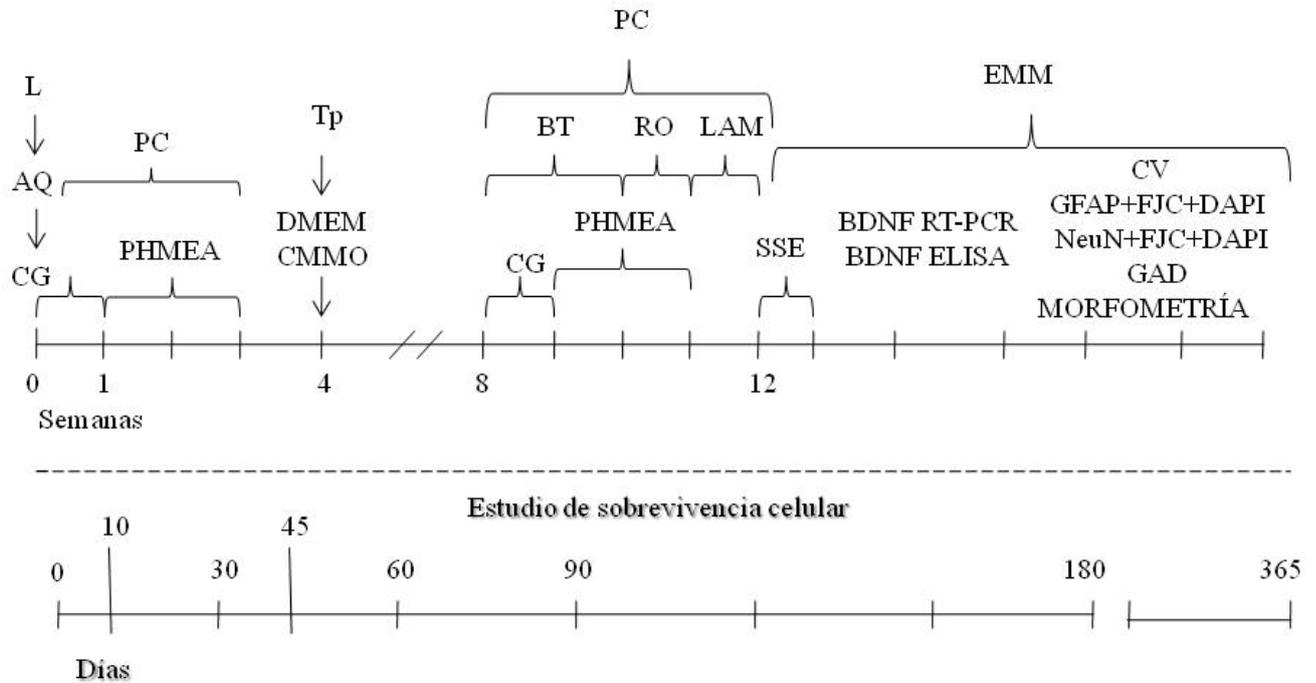


Figura 5. Diagrama Temporal del diseño experimental: L: lesión; AQ: ácido quinolínico; PC: Prueba conductual; CG: conducta de giro; PHMEA: prueba de habilidades manuales de las extremidades anteriores; Tp: trasplante; DMEM: medio dulbecco's modificado de eagle's ; CMMO: células mononucleares de la médula ósea; BT: barra transversal; RO reconocimiento de objetos; LAM: laberinto acuático de morris; EMM: estudios morfológicos y moleculares; SSE: sacrificio del sujeto experimental; BDNF: Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (de sus siglas en inglés: Brain Derived Neurotrophic Factor); ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (de sus siglas en inglés: Enzyme linked Immunoabsorbent Assay); RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (de sus siglas en inglés: Reverse transcription polymerase chain reaction); CV: cresil violeta; GFAP: proteína ácida fibrilar de la glía (de sus siglas en inglés: Glial Fibrillar Acid Protein); NeuN: marcador neuronal nuclear (de sus siglas en inglés: Neuronal nucleous); FJC: Fluorojade-C; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; GAD: descarboxilasa del ácido glutámico.

PRIMERA ETAPA

Implementación del modelo de enfermedad de Huntington

1. Modelo de lesión

Animales de experimentación

Se utilizaron 215 ratas machos adultas de la línea Sprague Dawley, distribuidas en 30 grupos experimentales, con pesos entre 200-250 gramos al comienzo del experimento, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB; Mayabeque), Cuba. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de humedad ($67 \pm 3 \%$) y a una temperatura media de 23 °C ($22 \pm 2 \text{ °C}$), con suministro de alimentos y agua *ad libitum* y períodos de luz y oscuridad de 12 horas. Las ratas se distribuyeron en grupos de 5 por cajas al inicio del experimento, y una vez que los animales se lesionaron se mantuvieron 3 por caja.

Ética:

Durante todos los procedimientos experimentales se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales, así como los requerimientos ambientales para el mantenimiento de los roedores, incluidos en los procedimientos normativos de operación del vivario del Centro Internacional de Restauración Neurológica y las normas establecidas por el Canadian Council on Animal Care (CCAC) (196).

Como criterios de exclusión del estudio se tuvieron en cuenta aquellas ratas que mostraron infecciones severas, lesiones en los ojos que les dificultaran la visión, o atrofia marcada de alguna extremidad en cualquiera de los grupos experimentales.

Evaluación del volumen de ácido quinolínico

Para evaluar el volumen a aplicar de ácido quinolínico se estudiaron 2 volúmenes: 1,4 y 1,2 μL a una concentración de 112.5 nmol/ μL , (Sigma, Saint Louis, USA).

Volumen de ácido quinolínico de 1,4 μL (157,5 nmoles)

Tabla 2. Grupos experimentales utilizados para evaluar el volumen de 1,4 μL de ácido quinolínico.

No.	Grupos experimentales	n
1	Ratas lesionadas con ácido quinolínico	10
2	Ratas falsas lesionadas (con solución salina fisiológica)	4
3	Ratas sanas	4

Con el fin de provocar la muerte neuronal de las células del cuerpo estriado, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral al 7 % [(420 mg/Kg de peso, intraperitoneal; (i.p.), Merck (Darmstadt, Alemania)] y se colocaron en un marco de cirugía estereotáctica para roedores (David Kopf Instruments, Tujunta, CA, USA). Se localizaron las siguientes coordenadas (mm) correspondientes al estriado derecho según el Atlas de Paxinos y Watson (197): AP=1,2 por delante de Bregma, L=2,8, a la derecha de Bregma y DV=5,5, por debajo de la duramadre. Localización de la barra incisiva a 2 mm por debajo de la línea interaural. Se inyectaron 1.4 μL de una solución de ácido quinolínico a una concentración de 112.5 nmol/ μL o igual volumen de solución salina fisiológica.

La inyección se realizó lentamente a una velocidad de flujo de 1 μL /minutos, utilizando una jeringuilla Hamilton (10 μL), la cual se mantuvo *in situ* 5 minutos después de finalizada la inyección, para evitar el reflujo de la solución.

Volumen de ácido quinolínico de 1,2 μ L (135 nmoles)Tabla 3. Grupos experimentales utilizados para evaluar el volumen de 1,2 μ L de ácido quinolínico.

No.	Grupos experimentales	n
1	Ratas lesionadas con ácido quinolínico	10
2	Ratas falsas lesionadas (con solución salina fisiológica)	4
3	Ratas sanas	4

El procedimiento quirúrgico utilizado fue igual al descrito anteriormente, con la diferencia que se inyectaron 1,2 μ L de la solución de ácido quinolínico a una velocidad de flujo de 1 μ L/minuto, la cual se mantuvo *in situ* 5 minutos después de finalizada la inyección, para evitar el reflujo de la neurotoxina.

El grupo de ratas falsas lesionadas fue obtenido de manera similar que el de ratas lesionadas con ácido quinolínico, con la diferencia que en lugar de ácido quinolínico se utilizó solución salina fisiológica.

Evaluación morfológica de la lesión.

Transcurridos 30 días de la inyección, los animales de todos los grupos experimentales (lesionados, falsos lesionados y sanos) se anestesiaron con hidrato de cloral [(420 mg/Kg de peso, intraperitoneal; (i.p.), Merck (Darmstadt, Alemania)] y se sacrificaron para la realización del estudio morfológico. La fijación de las muestras se llevó a cabo por el método de perfusión aórtica. Cada rata recibió 250 mL de solución salina fisiológica y luego 300 mL de solución fijadora [paraformaldehído al 4 % en buffer fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés buffer phosphate saline) al 0.1 mol/L, pH 7.3]. Los cerebros se extrajeron en la misma solución durante 3 horas. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en soluciones de sacarosa al 7, 15 y 30 % respectivamente durante 12 horas en cada caso y seguidamente se congelaron y almacenaron a -70 °C. Se realizaron cortes coronales a un grosor de 20 μ m, en un criostato digital (Leitz, 1720 Alemania). Se recogieron 2 series de 20 cortes

cada una representativas de la lesión y del núcleo estriado en láminas gelatinizadas y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior uso. Para determinar la pérdida neuronal estriatal una serie de secciones se coloreó con cresil violeta (CV) al 0.5 % y la otra serie se destinó a la determinación de la actividad astrocítica por el método inmunohistoquímico (IHQ); utilizando como marcador a la proteína ácida fibrilar de la glía, (GFAP, de sus siglas en inglés, Glial Fibrilar Acid Protein).

Cresil Violeta:

El cresil violeta se utilizó como coloración básica para mostrar la citoarquitectura general del estriado en los animales lesionados con ácido quinolínico. Después de realizadas las operaciones preliminares donde las láminas se dejaron por varios minutos a temperatura ambiente, las mismas se mantuvieron durante 2 horas en alcohol absoluto, seguidamente se expusieron a la solución de trabajo del colorante de cresil violeta durante 1 hora, buscando la homogeneidad en la penetración. Posteriormente se eliminó el exceso del colorante con abundante agua corriente. Se deshidrató utilizando alcohol absoluto con pases rápidos y se aclaró con xilol I, II, y III. Finalmente, para su análisis se cubrió la lámina con medio de montaje Eukitt® (Freiburg, Alemania). Los cortes fueron observados al microscopio de campo claro *Olympus SR-2* (Tokio, Japón).

GFAP: Las muestras se descongelaron y se lavaron (PBS 0.1M). A continuación se incubaron en una solución de bloqueo durante 20 minutos (PB 0.1 M, suero fetal de ternera al 20 % y tritón al 0.25 %). El anticuerpo primario policlonal anti-GFAP (1/1000, DAKO), el anticuerpo secundario biotinilado anti-Ig de conejo, (1/500, DAKO) y el complejo ABC peroxidasa (1/100, DAKO), se diluyeron con PBS que contenía suero fetal de ternera al 1 %, y 0.125 % de tritón X-100. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche y el anticuerpo secundario y el complejo ABC peroxidasa durante una hora. Posterior a cada una de estas incubaciones se efectuaron 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno. Para el revelado se utilizó 3,3 diaminobenzidina al 0.05 % y H_2O_2 al 0.01 %, y para detener la reacción agua destilada. Consecutivamente las secciones se deshidrataron en concentraciones

crecientes de alcohol, aclaradas en xilol y cubiertas con la solución de montaje Eukitt® (Freiburg, Alemania). La observación de las muestras se realizó en un microscopio de campo claro *Olympus* SR-2 (Tokio, Japón).

2. Células mononucleares de médula ósea de rata para el trasplante en el modelo de lesión por ácido quinolínico

Las células se obtuvieron del fémur de ratas machos Sprague Dawley con peso entre 250 y 300 gramos (n=40). Todo el material que se utilizó en la manipulación de las células se trabajó en condiciones estériles. El proceso de obtención, aislamiento y marcaje de estas células se describe brevemente a continuación, así como el método inmunohistoquímico empleado para la caracterización de las mismas:

Obtención de las CMMO

Las CMMO se aislaron a partir del fémur de la rata según se describe en el trabajo de Woodbury y cols. (190). Las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con hidrato de cloral al 7 % [(420 mg/Kg de peso, intraperitoneal; (i.p.), Merck (Darmstadt, Alemania)]. Se realizó un corte de la piel en las patas traseras, decolando el tejido paralelo al hueso. Seguidamente se realizó un corte alrededor de las epífisis distales del fémur. Durante 30 minutos se colocó el hueso extraído en una placa de Petri con cloruro de sodio al 0.9 %. En condiciones estériles se cortaron las epífisis distales del hueso para dejar expuesta la médula ósea y se le infiltró PBS en una sola dirección utilizando una jeringuilla de 10 mL. La suspensión rica en CMMO se colectó en tubos estériles para lavar y centrifugar posteriormente.

Aislamiento de las CMMO

Para el aislamiento celular se utilizó un gradiente de Ficoll y se siguieron las normas establecidas en el laboratorio de Inmunología del CIREN, como sigue:

La suspensión de CMMO se lavó con PBS 3 veces 10 minutos a 540 g 20 °C. en una proporción volumen a volumen. Se colocaron en un tubo de cristal 2.5 mL de ficoll- PaqueTM Plus (Amershan AB, Suecia), y se depositaron 5 mL de la suspensión de CMMO de forma cuidadosa, dejándola caer por las paredes del tubo evitando que se uniera el ficoll con la mezcla de PBS y células. Los tubos se centrifugaron durante 45 minutos a 840 g, a una temperatura de 20 °C. Finalizada la centrifugación se extrajo el anillo de células mononucleadas con una pipeta Pasteur. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos a 540 g a una temperatura de 20 °C. Finalizados los lavados por centrifugación el sobrenadante se desechó en un recipiente con hipoclorito 7 % y el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo (DMEM, del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + Suero Fetal Bovino (SFB) al 10 % + Glutamina 2 mM), (198).

El aislamiento de las CMMO se realizó con un alto rendimiento y buena viabilidad. En nuestro estudio se mantuvo este proceso bajo condiciones estrictas de esterilidad, lo que nos garantizó una muestra no contaminada con gérmenes para obtener resultados confiables.

Marcaje con solución de bisbenzimidida (Reactivo de Hoechst-33258) de las CMMO

A la suspensión de células resuspendidas en el medio de crecimiento (DMEM + SFB al 10 % + Glutamina 2 mM) se le añadió un volumen de solución de bisbenzimidida (Reactivo de Hoechst-33258, Sigma, USA) para obtener una concentración final del reactivo en el medio de 1µg/mL. Seguidamente las células se incubaron durante 12 horas en atmósfera de 5 % de CO₂. Al cabo de este tiempo las células se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos. El sobrenadante resultante de esta centrifugación se eliminó y el botón celular se lavó tres veces con 10 mL de medio de cultivo

DMEM. Las células marcadas mostraron un núcleo fluorescente azul en un microscopio Óptico/Fluorescencia (Olympus BX51, DM400) a una $\lambda=330-380$ nm (filtro ultravioleta). El conteo del número de células se realizó en cámara de Neubauer utilizando como colorante vital azul de tripám y la concentración final de la suspensión se ajustó en dependencia del tipo de experimento a realizar como será descrito en lo sucesivo. La viabilidad celular estuvo por encima del 90 % en todos los casos.

Caracterización inmunofenotípica de las CMMO

Para la caracterización de las CMMO se utilizó una técnica inmunocitoquímica que siguió las normas establecidas en el laboratorio de Inmunología del CIREN, brevemente se explica:

Se utilizó un formato de láminas de 12 pocillos que se recubrieron con las células mononucleares a las cuales se les uniría el anticuerpo monoclonal específico contra una de las proteínas en estudio: CD34 (1/40, DAKO) reconoce células estromales y hematopoyéticas, CD38 (1/200, DAKO) reconoce células hematopoyéticas, CD45 (1/50, DAKO) reconoce células hematopoyéticas y CD90 (1/20, DAKO) reconoce células estromales. Después del lavado la cantidad de anticuerpo monoclonal unido específicamente se detectó mediante el uso de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado (1/700, DAKO) con biotina, que actuó como anticuerpo secundario. El complejo Avidina Biotina/Fosfatasa Alcalina (1/100, DAKO) se diluyó en PBS y suero fetal de ternera al 1 % y 0.125 de tritón X-100. Para el anticuerpo primario la incubación fue durante toda la noche a 4 °C y para el anticuerpo secundario y el complejo Avidina Biotina/Fosfatasa Alcalina se mantuvo tiempos de incubación de 50 y 45 minutos a temperatura ambiente respectivamente. Para el revelado se utilizó naftol (1mL) y como cromógeno el 4-cloro 2-metilbencenodiazonio (fas red). Este procedimiento permitió la entrada de la avidina para amplificar la respuesta del sistema cuando se le añadió el sustrato cromogénico. La lectura se realizó en un microscopio de luz (OLYMPUS, BO61).

3. Establecimiento de la concentración de células mononucleares de médula ósea para el trasplante

Este experimento estuvo dirigido a evaluar cuál de las concentraciones de CMMO trasplantadas lograba una mejor supervivencia e integración en el tejido hospedero.

Grupos experimentales

Se crearon tres grupos experimentales que fueron lesionados en el estriado con ácido quinolínico (1,2 μL) y trasplantados con tres concentraciones diferentes de la suspensión celular (Tabla 4)

Tabla 4. Concentración de células utilizadas (cel/ μL) en la estandarización de la concentración de CMMO

Grupo experimental	n	Concentración celular por depósito (cel/ μL)	Número de depósitos	Volumen por depósito (μL)	Número total de células trasplantadas
Grupo I	8	150 000	2	1	300 000
Grupo II	7	100 000	2	1	200 000
Grupo III	7	50 000	2	1	100 000

Procedimiento experimental

Las CMMO marcadas con bisbenzimidida se trasplantaron por cirugía esterotáctica, en el estriado derecho de ratas lesionadas con ácido quinolínico (1,2 μL). Para el trasplante se seleccionó la coordenada (con respecto a Bregma): AP= 0,7 mm por delante de Bregma, L= 2,8 mm a la derecha de Bregma, V₁= 5,5 mm, V₂= 4,6 mm (por debajo de la duramadre) y el volumen final de la suspensión celular implantada fue de 2 μL (1 μL /depósito) (Tabla 4).

Criterios para seleccionar la concentración de CMMO para el trasplante

Supervivencia de las células trasplantadas.

Migración de las células: Se evaluó la extensión anteroposterior del trasplante, así como la localización anatómica del mismo.

Evaluación morfológica de la concentración de CMMO para el trasplante

Se realizó la evaluación morfológica de la concentración de CMMO a los 30 días posteriores al trasplante. El sacrificio de los animales, la extracción del cerebro, el procesamiento, la conservación y el corte se realizó como se describió en el acápite *Evaluación morfológica de la lesión*. Para la visualización de las CMMO, los cortes histológicos se observaron al Microscopio Óptico/Fluorescencia (Olympus BX51, DM400) a una longitud de onda de 330-380 nm (filtro ultravioleta).

4. Estudio de la supervivencia de las células mononucleares de la médula ósea

Para evaluar la supervivencia de las células trasplantadas, las ratas fueron anestesiadas con una inyección de hidrato de cloral al 7 % [(420 mg/Kg de peso, intraperitoneal; (i.p.), Merck (Darmstadt, Alemania)] y perfundidas intracardiácamente con solución salina fisiológica al 0.9 % seguido de paraformaldeído al 4 %. Los cerebros se extrajeron y fijaron durante 2 horas en paraformaldeído al 4 % a 4 °C. El tejido se transfirió a soluciones crecientes de sucrosa 7 %, 15 % y 30 % en KPBS a 4 °C. Posteriormente se congelaron por inmersión en isopentano con CO₂ y conservados (-80 °C) hasta su uso. Se realizaron cortes coronales en serie (20 µm) del estriado utilizando un criostato a -20 °C (Leitz, 1720 digital, Alemania). Los cerebros se extrajeron en diferentes momentos: (n=3) a los 10, 30, 45, 60, 90, 180, y 365 días después del trasplante. Se obtuvieron tres series de láminas para realizar la observación. En todos los casos, el estriado se seccionó a 20 µm utilizando como

referencia la comisura blanca anterior de acuerdo al atlas estereotáxico (197). Las células marcadas con bisbenzimidida se detectaron en un Microscopio Óptico/Fluorescencia (Olympus BX51, DM400) a una $\lambda=330-380$ nm (filtro ultravioleta).

SEGUNDA ETAPA

Trasplante de células mononucleares de médula ósea

Se trabajó con la concentración celular ajustada a 50 000 cel/ μ L, en 2 depósitos en el estriado lesionado con ácido quinolínico (1,2 μ L; 135 nmoles).

Cuatro semanas después de la lesión, los sujetos experimentales se anestesiaron con hidrato de cloral al 7 % [(420 mg/Kg de peso, intraperitoneal; (i.p.), (Merck, Darmstadt, Alemania)]. Las ratas se colocaron en el marco de cirugía estereotáctica y se abrió la piel. Con una jeringuilla Hamilton, la suspensión de células de médula ósea (50 000 cel/ μ L) se inyectó en el cuerpo estriado lesionado (en dos depósitos; 1 μ L por depósito) en una coordenada ligeramente diferente de la utilizada para la lesión con ácido quinolínico: 0,7 mm anterior de Bregma, 2,8 mm lateral desde la línea media y 5,5 mm y 4,6 mm por debajo de la superficie de la duramadre. Las células se inyectaron lentamente durante un período de 1 minuto. Una vez finalizada la inyección de la suspensión celular, la aguja permaneció en el sitio de inyección por 10 minutos. Pasados los mismos fue retirada cuidadosamente. El grupo control del trasplante recibió un volumen igual de medio de cultivo (DMEM) el cual se inyectó de la misma forma y en la misma coordenada estereotáctica.

TERCERA ETAPA

Pruebas conductuales

Para todos los grupos experimentales las pruebas conductuales se realizaron un mes después del

trasplante de CMMO.

Grupos experimentales: Se utilizaron animales de la línea Sprague Dawley machos adultos con peso corporal entre 200 y 250 gramos.

Tabla 5. Grupos experimentales utilizados para evaluar la conducta motora y cognoscitiva en los animales de experimentación antes y después del trasplante con CMMO.

Grupo	Designación del grupo experimental	n
I	Ratas Sanas	10
II	Ratas con lesión de ácido quinolínico	10
III	Ratas con lesión de ácido quinolínico y trasplantadas con CMMO	10
IV	Ratas con lesión de ácido quinolínico e inyectadas con DMEM	10

CMMO: células mononucleares de medula ósea); DMEM: medio dulbecco's modificado de eagle's (de sus siglas en inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

Actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

Una semana después de la lesión con ácido quinolínico y un mes después del trasplante de CMMO/DMEM, se evaluó la actividad rotatoria inducida por la inyección (i.p.) de D-Anfetamina [5 mg/kg de peso, Sigma, (St. Luis, MO, EE.UU.)]; (199), con el objetivo de evaluar la asimetría motora en los sujetos experimentales. Se utilizó un Multicontador LE3806 (*PanLab, España*) acoplado a un sensor LE3806, que cuantifica automáticamente los giros que realiza el animal hacia la derecha y/o izquierda durante 90 minutos.

Los animales de todos los grupos experimentales se evaluaron en grupos de 2 a 3, siempre en el horario de la mañana, propiciando las mismas condiciones en cada día de evaluación. Los datos fueron recogidos en las planillas confeccionadas al efecto (ANEXO 1).

Evaluación de las Habilidades Motoras de las Extremidades Anteriores

Este experimento evaluó la habilidad que muestra la rata al utilizar sus extremidades anteriores para capturar el alimento en una caja de restricción (200). Se emplearon cajas de acrílico transparente (3

mm de espesor) de 28 cm de largo, 6,6 cm de ancho y 6,8 cm de altura (taller de prototipo, CIREN). Aproximadamente los dos tercios anteriores de la extensión de la caja están ocupados por una plataforma central de 4,7 cm de alto y 2,9 cm de ancho, con espacios a ambos lados para insertar una escalerilla móvil de seis escalones en cada uno de los extremos. Cada escalón y el nivel inferior (piso de la caja) poseen una pequeña concavidad, donde se sitúan dos trozos de alimento con sabor diferente al que normalmente ingieren, por lo cual la rata dispone de catorce alimentos a cada lado. La plataforma central impide que el animal alcance el alimento de un lado con la extremidad contraria. La base del extremo posterior de la caja se eliminó para posibilitar el acceso de la rata al compartimiento interior (ANEXO 2).

Los animales se sometieron a un régimen de privación del alimento y simultáneamente se entrenaron en esta prueba durante tres días previos a la evaluación de la misma. A continuación durante seis días se realizó el conteo del número de alimento que deja la rata en cada peldaño de la escalerilla ubicada a cada lado de la plataforma central que posee la caja experimental. Los datos fueron recogidos en las planillas confeccionadas al efecto (ANEXO 3).

Prueba de la Barra Transversal

Este experimento evaluó el equilibrio y la coordinación motora del sujeto experimental cuando disminuye la superficie de apoyo (201). La prueba se realizó en condiciones apropiadas de silencio e iluminación. La medida cuantitativa de la conducta del sujeto experimental se obtuvo usando un sistema de video-trayectoria (Panlab, Barcelona, España) conectado al programa analítico SMART (del inglés, Spontaneous Motor Activity Recording Tracking, V 2.0) de la misma compañía. Una cámara de video, en la parte superior y central, permitió captar una imagen que se visualizó en el monitor de la computadora. Las ratas se colocaron en el punto medio de la barra de 60 cm de longitud en cuyos extremos se ubicaron plataformas de escape redondas de 15 cm de diámetro. La barra se situó a una altura de 60 cm del suelo e inmediatamente debajo de la misma se situaron

pequeñas mantas de aire con el propósito de proteger a los animales de posibles golpes si caían de la barra. Cada ensayo tuvo una duración de 1 min y se cuantificó la distancia recorrida durante el ensayo. Las barras se presentaron en el siguiente orden: Barra Cuadrada Grande; (BCG: 2.5 cm); Barra Redonda Grande (BRG: 2.5 cm); Barra Cuadrada Pequeña (BCG: 1 cm); Barra Redonda Pequeña (BRG: 1 cm). El experimento completo se realizó durante dos días consecutivos, efectuándose dos ensayos cada día, lo que equivale a cuatro intentos por barra. La distancia recorrida fue computada como la media de los cuatro valores obtenidos en cada tipo de barra. Los datos fueron recogidos en las planillas confeccionadas al efecto (ANEXO 4).

Prueba de Reconocimiento de Objetos

Este experimento evaluó la tendencia espontánea del sujeto experimental de estar más tiempo explorando un objeto nuevo a uno que le resulta familiar. La prueba empleó una caja cuadrada de madera (50 x 50 cm) con paredes de 60 cm de altura (202). El primer día se colocaron en la posición A y B dos objetos idénticos en forma, color y tamaño. En cada ensayo se colocó la rata en el centro de la caja, cerca de las paredes y detrás de los objetos. Se les permitió a las ratas moverse libremente durante 3 minutos, midiéndose el tiempo (segundos) de exploración que emplearon para cada objeto. El segundo día de la prueba, el objeto B fue reemplazado por un nuevo objeto en su misma localización, pero con diferente tamaño y forma. Para la realización de esta prueba los objetos presentados se trabajaron con colores diferentes (blanco y verde), los que fueron probados previamente en ratas sanas, demostrándose que los sujetos experimentales pueden identificar y diferenciar estos colores sin dificultad. Se midió en cada ensayo, el tiempo de exploración empleado por el sujeto experimental para cada objeto. Los datos fueron recogidos en las planillas confeccionadas al efecto (ANEXO 5).

Laberinto Acuático de Morris

Este experimento estuvo dirigido a evaluar el efecto del trasplante de CMMO sobre los trastornos de memoria y aprendizaje del sujeto experimental (203).

Se utilizó una piscina circular de acero inoxidable blanca, (150 cm de diámetro, nivel de agua=40 cm, Temperatura del agua=24 °C) con una plataforma de escape transparente y circular (diámetro=11 cm) oculta a una profundidad de 1 cm por debajo del nivel del agua y en una posición fija durante todo el experimento.

Requisitos de la prueba: Ausencia de ruidos u otras señales que pudieran provocar inatención o desorientación del sujeto experimental. Las señales para servir de orientación fueron solo de tipo extralaberínticas. El experimentador se situó lejos y de aproximarse lo hizo en continuo movimiento para evitar convertirse en falso punto de referencia. Se previno la hipotermia del animal de experimentación durante e inmediatamente después del ensayo.

Procedimiento: Las ratas que realizaron esta prueba lo hicieron en dos condiciones diferentes; en la primera condición se mantuvo la plataforma no visible durante 4 días consecutivos y en la segunda condición se realizó la prueba con la plataforma visible. Total de días de ensayo: 5. Total de ensayos: 37, distribuidos 8 por día incluyendo el último día y 5 ensayos el penúltimo día. En los primeros 28 ensayos y últimos 8 correspondientes al último día se evaluó la latencia de escape y en el ensayo 29 (sin plataforma) correspondiente al cuarto día se registró el número de cruces análogos (cantidad de veces que la rata pasa por el sitio donde estaba la plataforma). Los primeros cuatro días la plataforma se colocó en una posición de orientación fija, suroeste (SO), el último día la plataforma se orientó en una posición diferente, noreste (NE). De manera que quedara visible y en una posición diferente a la utilizada en los días anteriores, lo cual nos descartó la posibilidad de que el animal experimental tuviera algún problema con la capacidad motora o visual que le impidiera realizar la tarea. El sitio de

salida en el laberinto acuático de Morris (LAM), siempre fue diferente en los distintos ensayos para un día, y se seleccionaron al azar, esperando 30 segundos antes de iniciar el nuevo ensayo. La rata se ubicó siempre de frente a la pared y se le permitió nadar por 60 segundos. Si en este tiempo no localizó la plataforma de escape se le colocó sobre ella durante 30 segundos para después dar inicio al ensayo siguiente. Se promediaron los datos de cuatro ensayos consecutivos; por consiguiente se obtuvieron dos valores para cada día de entrenamiento excepto el cuarto día en el cuál se computó un solo valor para la variable. Los datos fueron recogidos en las planillas confeccionadas al efecto (ANEXO 6).

Obtención y almacenamiento de muestras de cerebro para estudios morfológicos y moleculares

Después de realizado el trasplante y las pruebas conductuales, las ratas se sacrificaron utilizando el protocolo de trabajo de acuerdo al estudio morfológico y/o molecular que se pretendía realizar, el cual se describirá en detalles en la sección correspondiente.

Estudios moleculares

Expresión génica de BDNF por RT-PCR (de sus siglas en inglés, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Tabla 6. Grupos experimentales utilizados para evaluar la expresión de genes de BDNF después de la lesión con ácido quinolínico y el trasplante con CMMO

Grupo	Designación del grupo experimental	n
I	Ratas Sanas	4
II	Ratas con lesión de ácido quinolínico	4
III	Ratas con lesión de ácido quinolínico y trasplantadas con CMMO	4
IV	Ratas con lesión de ácido quinolínico e inyectadas con DMEM	4

DMEM: (de sus siglas en inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium); CMMO: células mononucleares de medula ósea.

A) Extracción del ARN total

Para la extracción de ácido ribonucleico (ARN) total se utilizó el método del TRIzol® (204). Se utilizó 1 mL de TRIzol® (Invitrogen, EU) por cada gramo de tejido. El lisado celular se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 200 µL de cloroformo por cada mL de Trizol® empleado, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. El lisado celular obtenido se centrifugó a 7 500 g a 4 °C durante 15 minutos. Se obtuvieron tres fases: una fase superior que contenía el ARN total, una fase intermedia que contenía el ácido desoxiribonucleico (ADN) y una fase inferior que contenía las proteínas totales.

La fase superior, que contenía el ARN total, se separó y se le adicionó 500 µL de isopropanol y se mezcló por inversión 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 7 500 g a 4 °C durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se lavó con 1 mL de etanol al 75 % y se resuspendió en agua tratada con 0.1 % de dietilpicrocarbonato (DEPC). Para calcular la concentración y grado de pureza del ARN obtenido se realizó la lectura a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón).

Se conoce que el ARN tiene la capacidad de absorber la luz UV a 260 nm y una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 µg/mL de ARN de cadena simple. Por tanto la concentración fue calculada utilizando la fórmula sugerida por el fabricante (204).

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = (\text{DO}_{260} - \text{DO}_{280}) \times \text{volumen total} \times 40 \times \text{factor de dilución}$$

La absorbancia a 280 nm se utilizó como un indicativo del grado de pureza de los ácidos nucleicos, ya que a esa longitud de onda las proteínas absorben la luz UV. La pureza de la muestra se estimó calculando la relación $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$. Paralelamente se analizó una muestra en un gel de agarosa al 1.5 % con formaldehído y se utilizó bromuro de etidio para visualizar el ARN.

B) Reacción de reverso transcripción

Una muestra de 5 µg de ARN total se centrifugó 15 minutos a 7 500 g a 4 °C, y el precipitado se lavó dos veces con etanol absoluto al 75 %. Se centrifugó en igualdad de condiciones, se desechó el sobrenadante, se incubó a 55 °C durante 2 ó 3 minutos y se resuspendió en 11µL de agua/dietilpirocarbonato. Se adicionó 1 µL de oligos dT (0,5 µg), (Promega, EU). Se calentó durante 10 minutos entre 70-75 °C, y se colocó en hielo inmediatamente durante 5 minutos. Mientras se mantenía el ARN total y los oligos dT en hielo se preparó la mezcla de reacción que incluyó: 4 µL de buffer 5X (Promega, EU) de la primera cadena, 2 µL de ditiotritol 0,1 M y 1 µL de una mezcla equimolar de dinucleótido de fosfato 25 µM (Promega, EU). La mezcla de reacción se agitó en un vortex por 2 segundos y posteriormente se centrifugó. Se agregó la mezcla de reacción al vial que contenía el ARN y los oligos dT y nuevamente se centrifugó. Se calentó por 2 minutos a 42 °C y se le agregó 1 µL de la enzima de la reverso transcriptasa (M-MLV) (Promega, EU). Se centrifugó 15 minutos a 7 500 g a 4 °C. Se incubó 50 minutos a 42 °C y se calentó 15 minutos entre 70-75 °C.

C) Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *de sus siglas en inglés polimerase chain reaction*) a partir del ADNc se realizó utilizando el “Access RT-PCR Systems” (Promega). Se amplificó tomando 2 µL del ADNc. Se preparó la mezcla de la reacción de PCR la cual contenía: ADN 2 µL (100 ng de ADN en 2 µL); oligonucleótido 5’ específico 1 µL (50 pmol/µL); oligonucleótido 3’ específico 1 µL (50 pmol/µL); Buffer 10X 5 µL; dimetilsulfóxido (DMSO) 5 µL; dNTP mezcla 1 µL (25 mM); MgCl₂ 1 µL (50 mM); Taq polimerasa 0,3 µL; y H₂O hasta completar un volumen final de 50 µL. Seguidamente se colocaron las muestras en el equipo de PCR (termociclador: Mastercycler personal eppendorf, Alemania) y comenzó la reacción según el programa siguiente:

β-actina (40 ciclos)		BDNF (40 ciclos)	
Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo

94 °C	2 minutos	94 °C	2 minutos
94 °C	30 segundos	94 °C	30 segundos
51 °C	30 segundos	60 °C	30 segundos
72 °C	30 segundos	72 °C	30 segundos
72 °C	5 minutos	72 °C	2 minutos

Oligonucleótidos sintéticos

Para la determinación de la producción de factores neurotróficos por las CMMO, mediante RT-PCR, se usaron oligonucleótidos sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba.

BDNF	Oligo sentido	5' - ttg gcc tac cca gct gtg cgg ac -3'
	Oligo antisentido	5' - ctc ttc gat cac gtg ctc aaa agt g -3'
β-actina	Oligo sentido	5' - att tgg cac cac act ttc tac a-3'
	Oligo antisentido	5' - tca cgc acg att tcc ctc tca g-3'

Patrones de peso molecular (PPM) utilizados: PPM para ácidos nucleicos: Patrón constituido por los fragmentos de 12216/ 11198/ 10180/ 9162/ 8144/ 7126/ 6108/ 5090/ 4072/ 3054/ 2036/ 1636/ 1018/ 513 y 506/ 396/ 344/ 298/ 220/ 201/ 154/ 134 y 75 pares de bases (pb); (Promega).

D) Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de ADN amplificados con oligonucleótidos específicos para β-actina y BDNF de cada PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % preteñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL de gel), a 70 V en tampón amortiguador tris-borato-EDTA (TBE) (tris 0.004 M, ácido bórico 0.001 M y EDTA 0.5 M; pH 8). Se aplicaron de 20 a 25 µL de las muestras antes mezcladas con el tampón de aplicación (bromofenol azul 0.25 %, sacarosa en agua destilada al 40 %) en una proporción de 5 µL del tampón y 20 µL de la muestra. Las bandas de los productos de amplificación se evidenciaron por medio de luz UV y las imágenes se digitalizaron a través de un sistema de análisis y foto documentación de imágenes (Alpha Innotech corporation IS-1000 digital Imaging System). El análisis de las bandas se realizó mediante el programa ImageJ 1.44p.

Cuantificación de la proteína BDNF

Este experimento estuvo encaminado a determinar la concentración del BDNF en las áreas cerebrales involucradas directamente en la patogenia de la enfermedad de Huntington (estriado y corteza), en los diferentes grupos experimentales. En todos los casos fueron usados los dos hemisferios cerebrales, derecho e izquierdo y se analizaron dos estructuras: corteza y estriado, por lo que por cada sujeto de experimentación se analizaron 4 muestras (Tabla 7).

Tabla 7. Grupos experimentales utilizados para evaluar la concentración de BDNF después del trasplante con CMMO.

Grupo	Designación del grupo experimental	No. Ratas	Estriado	Corteza	Total
I	Ratas sanas	10	20	20	40
II	Ratas con lesión de ácido quinolínico	10	20	20	40
III	Ratas con lesión de ácido quinolínico y trasplantadas con CMMO	10	20	20	40
IV	Ratas con lesión de ácido quinolínico inyectadas con DMEM	10	20	20	40

DMEM: medio dulbecco's modificado de eagle's (de sus siglas en inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium); CMMO: células mononucleares de medula ósea.

Forma de obtención de la muestra:

Las ratas se decapitaron bajo anestesia (se utilizó una dosis letal de hidrato de cloral al 7 %: por encima de los 420 mg/kg de peso) los cerebros se extrajeron y se lavaron en solución salina fisiológica al 0.9 %, a 4 °C. Seguidamente las áreas cerebrales (estriado y corteza) se disecaron sobre hielo, y posteriormente se congelaron en hielo seco. Las muestras obtenidas de esta forma se guardaron a -70°C hasta su uso.

Preparación de las muestras de tejido

Homogenización del tejido cerebral de rata:

Los extractos de tejidos se prepararon usando el tampón de lisis, el cual contenía los siguientes componentes: NaCl 137 mM; Tris-HCL (pH 8.0) 20 mM; NP40 1 %; Glycerol 10 %; PMSF 1 mM; Aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; y Sodio Vanadate 0.5 mM. Las muestras de tejido se pesaron y homogenizaron en el tampón de lisis previamente descrito; con una relación peso de tejido/volumen de 1/1. El proceder de homogenización se realizó sobre un baño de hielo para garantizar que las muestras se mantuvieran frías. Se aplicaron 20 golpes a 771 g (Homogenizador Bioblock Scientific) y se aisló la fracción citológica por centrifugación a 780 g durante 30 minutos.

Preparación de la curva estándar de BDNF

Con el estándar de BDNF que proporciona el fabricante, se generó una curva lineal que fue desde 0 a 500 pg/mL. Para determinar las concentraciones de BDNF de las muestras en estudio, solamente se usaron los valores que se encontraron en el rango lineal. El BDNF estándar (Promega, cat. G7610, USA) se suministró en el estuche a una concentración de 1 µg/mL. El estándar de BDNF se diluyó en el tampón 1X de la muestra y del bloqueo quedando a una dilución de 1: 2 000 con una concentración de 500 pg/mL de BDNF (punto de mayor concentración de la curva patrón). A partir de aquí se realizaron diluciones seriadas (100 µL/pozo) para obtener los restantes 6 puntos de la curva estándar: 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62.5 pg/mL; 31.3 pg/mL; 15.6 pg/mL; 7.8 pg/mL.

Desarrollo del Ensayo Inmunoenzimático para el BDNF

Para la detección sensible y específica de BDNF se utilizó un formato de doble sitio de anticuerpos (BDNF Emax Sistema de Inmunoensayo, Promega Corporation, Madison, EE.UU.). En este formato, las placas de 96 pocillos de fondo plano se revistieron con el anticuerpo monoclonal anti-BDNF para unirse al BDNF soluble. El BDNF capturado se une a un segundo anticuerpo policlonal específico para BDNF. Después del lavado correspondiente, se detectó la cantidad de anticuerpo policlonal unido específicamente al BDNF de la muestra utilizando como reactivo terciario un anticuerpo anti-IgG específico de la especie conjugado con peroxidasa de rábano picante. El anticuerpo conjugado no unido se elimina mediante lavados, y después de la incubación con un sustrato cromogénico, se mide la intensidad del color, en un lector de microplaca automático (ELx 800uv). La cantidad de BDNF en la solución de ensayo es proporcional al color generado en la reacción de oxidación-reducción.

Estudios morfológicos cualitativos

Al terminar las pruebas conductuales, las ratas se anestesiaron y los cerebros que se extrajeron se procesaron como se describió en la sección *de la supervivencia de las CMMO*. Para el análisis con cresil violeta e inmunohistoquímico se realizaron series de 6 secciones, tomadas todas de la misma región en todos los grupos a través del eje rostrocaudal del estriado dorsal.

ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Cresil Violeta

Esta coloración básica se utilizó para mostrar la citoarquitectura general del estriado en animales lesionados y trasplantados con CMMO. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el acápite de la evaluación morfológica de la lesión (Ratas, n=10 por cada grupo).

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Marcador Glial: Glial Fibrilar Acid Protein (GFAP)

GFAP + Fluoro Jade-C (FJC)+ DAPI

Los cortes de tejido se lavaron tres veces en PBS, se transfirieron a láminas gelatinizadas. Se incubaron durante 48 horas con el anticuerpo anti GFAP policlonal de conejo, diluido en 1:3000 en PBS que contenía 0.3% Tritón X-100 (PBS-Tritón X-100 0.3 %) y 2 % de Albumina Sérica Bovina (BSA 2 %). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Después de lavar varias veces en PBS, los cortes de tejidos se incubaron con el anticuerpo anticonejo o antiratón Cy3, ambos diluidos 1:500 en PBS-Tritón X-100 0.3 % y BSA 2 % por 1 hora a temperatura ambiente. Para visualizar las neuronas en degeneración, las láminas se secaron y se expusieron a la coloración Fluoro-Jade C (FJC) según Ehara & Ueda (205). Brevemente, las láminas se lavaron durante 5

minutos en agua destilada, y se incubaron con 0.06 % de solución de permanganato de potasio durante 10 minutos. Inmediatamente se lavaron con agua destilada durante 2 minutos, y se incubaron 10 minutos en una solución de coloración de fluorojade C con DAPI 0.001 %. Las láminas después de lavadas y secas se recubrieron con medio de montaje acuoso. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal FV-1000 (Olympus IX-81) y analizadas con el programa Olympus Fluoview.

Marcador Neuronal: Neuronal Nuclear (NeuN)

NeuN + Fluoro Jade-C (FJC+ DAPI)

Se siguió el mismo procedimiento que se describió para la determinación de GFAP, solo que en este caso se utilizó el anticuerpo anti-NeuN de ratón (clone A60), diluido 1:1000 en PBS.

Marcador Gabaérgico: Descarboxilasa del Ácido Glutámico (GAD)

Descarboxilasa del Ácido Glutámico

Los cortes de tejido se lavaron tres veces en tampón fosfato (TF) 0.1 M por 5 minutos, y se transfirieron a los pozos de la placa, se lavaron 3 veces con TF 0.1M durante 5 minutos y con N4HCl 50 mM durante 10 minutos, para evitar la autofluorescencia del tejido. Posteriormente se lavó con TF 0.1 M 3 veces por 5 minutos y se paso a lavar con la solución de bloqueo 1 durante 20 minutos a 37 °C. Se incubaron los cortes durante 48 horas con el anticuerpo monoclonal Anti Descarboxilasa del Ácido Glutámico 67 (GAD67) Clon k87 (producido en Ratón) diluido 1:500 en PBS que contenía 0.3 % Tritón X-100 (PBS-Tritón X-100 0.3 %) y 2 % albumina sérica bovina. Los controles negativos se obtuvieron omitiendo el anticuerpo primario. Después de lavar con TF 0.1M 3 veces por 5 minutos, los cortes de tejido se incubaron con el anticuerpo Alexa Fluor 594 con emisión de fluorescencia roja usado en compañía del GAD diluidos 1:500 en PBS-Tritón X-100 0.3 % y BSA 2 % por 2 horas a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 3 veces con TF 0.1 M por 5 minutos, se

eliminó el exceso del TF, se aplicó una gota de Fluoromount® en las placas y se colocó el cubreobjetos. Una vez seca se selló la placa con esmalte transparente. Las imágenes se realizaron en un microscopio de Fluorescencia Fluid, Cell Imaging Station de Life Technologies.

Análisis morfológico cuantitativo

Densidad neuronal (marcador NeuN) en el estriado lesionado con ácido quinolínico y trasplantado con CMMO

La densidad neuronal se calculó utilizando el programa Image J previamente calibrado (206). El estudio se realizó en 5 imágenes de estriado por cada sujeto experimental, tomadas con la lente objetiva de 40X en un microscopio confocal FV-1000 (Olympus IX-81). Se contaron las neuronas conservadas dentro de la imagen. Se consideraron neuronas conservadas las que presentaban un núcleo distinguible fácilmente con morfología redondeada y citoplasma homogéneo. Se calculó la densidad neuronal, dividiendo el número de neuronas entre el área de la imagen correspondiente (207). El área total de cada imagen fue de 63022, 435 μm^2 y el resultado se expresó como neuronas por mm^2 .

Densidad de astrocitos (marcador GFAP) en el estriado lesionado con ácido quinolínico y trasplantado con CMMO

La densidad de astrocitos se calculó utilizando el programa Image J previamente calibrado (206). El estudio se realizó en 5 imágenes de estriado por cada sujeto experimental, tomadas con la lente objetiva de 40X en un microscopio confocal FV-1000 (Olympus IX-81). Se contaron los astrocitos presentes dentro de la imagen. Se tuvieron en cuenta aquellos que fueron distinguibles fácilmente por un contorno definido de su morfología estrellada. Se calculó la densidad de los astrocitos, dividiendo el número de astrocitos entre el área de la imagen correspondiente (207). El área total de cada

imagen fue de 63104,333 μm^2 y el resultado se expresó como astrocitos por mm^2 .

Análisis de los datos

En todos los casos se realizó a los datos la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov. Igualmente se probó la homogeneidad de varianzas mediante la Prueba de Levene. En los casos que no hubo distribución normal de los datos se utilizaron pruebas no paramétricas. Con vista a conocer el comportamiento de los grupos, en los diferentes estudios se realizó estadística descriptiva. La comparación de la conducta de giro y habilidad que muestra la rata al utilizar sus extremidades anteriores para capturar el alimento entre grupos experimentales se evaluó por medio de un análisis de varianza no paramétrica (ANOVA) (prueba de Kruskal Wallis), seguida de una prueba no paramétrica de comparación de rangos (Prueba de Dunn). Por su parte estas mismas variables dentro de los grupos experimentales se evaluaron utilizando la prueba de Wilcoxon para datos pareados. La comparación entre los grupos experimentales para las variables: distancia recorrida en la barra (Prueba de la barra transversal), tiempo de exploración (Prueba de exploración de objetos) latencia de escape y número de cruces (Prueba del laberinto acuático de Morris) se efectuó por medio de un análisis ANOVA bifactorial, seguida de una prueba de Tukey. La comparación de la expresión relativa de *bdnf* normalizada a la beta actina, así como la concentración de BDNF en las estructuras estudiadas entre los diferentes grupos experimentales se realizó mediante un análisis ANOVA bi y trifactorial respectivamente, seguida de una prueba de Tukey. La densidad neuronal y astrocítica se realizó mediante un análisis ANOVA de clasificación simple, seguida de una prueba de Tukey. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05 y se procesó toda la información recogida mediante el programa profesional Statistica para Windows, Versión 6.0, Copyright Statsoft, Inc. 1993.

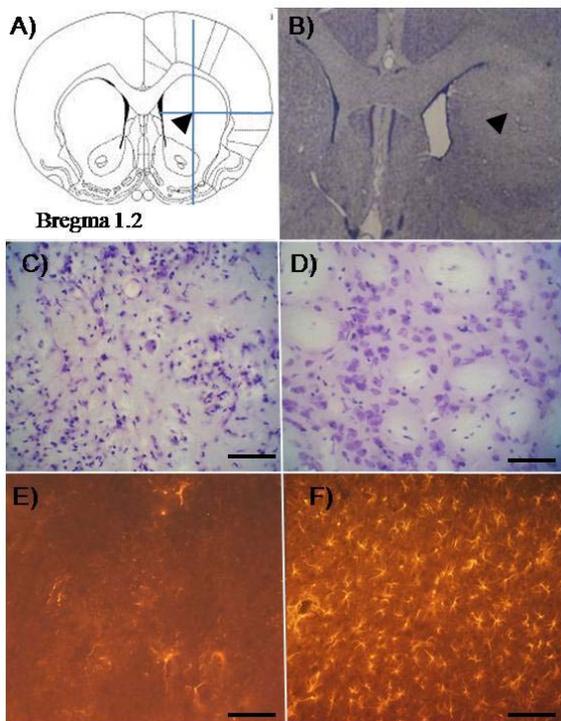
RESULTADOS

Implementación del modelo de enfermedad de Huntington

1. Modelo de lesión

Volumen de ácido quinolínico de 1,4 μ L (112.5 nmol/ μ L)

La Figura 6A representa un diagrama coronal con la coordenada de la lesión con ácido quinolínico. La Figura 6B, muestra como la inyección con ácido quinolínico en el estriado derecho provocó la pérdida parcial de neuronas estriatales que se acompañó de una dilatación del ventrículo lateral, característica que se diferencia de lo observado en el estriado contralateral sano. La observación en campo claro con la coloración de cresil violeta que tiñe los cuerpos de Nissl presentes en el soma y las dendritas neuronales así como el núcleo de las células gliales muestra la pérdida de la imagen en parches característica del estriado (Fig. 6D) cuando se comparó con el estriado sano (Fig. 6C). Con microscopia de fluorescencia, la detección inmunohistoquímica de la GFAP demostró abundante gliosis astrocítica (Fig. 6F), cuando fue comparado con el estriado sano (Fig. 6E).



Estudio morfológico de la lesión con ácido quinolínico en el estriado (imagen representativa de n=10). A) Diagrama coronal que muestra la coordenada de la lesión con ácido quinolínico (G. Paxinos and C. Watson, 2006). B) Corte coronal de estriado sano y lesionado marcado con una flecha. C y D estriado sano y lesionado (200x), respectivamente, con coloración de cresil violeta. E y F estriado sano y lesionado (200x), respectivamente, con inmunopositividad para la GFAP en F. Escala de barra: (50 μ m) para C y D, y (20 μ m) para E y F.

Forma y extensión de la lesión: La forma del área lesionada es ovoidal y en ocasiones algo irregular. El volumen de la lesión no abarca la totalidad del estriado, pero ocupa la mayoría del mismo. El núcleo estriado se extiende desde la coordenada +2.2 hasta -3.8 con respecto a Bregma en sentido anteroposterior, lo que abarca una extensión en este eje de 6 mm aproximadamente. Para el volumen de 1,4 μL de ácido quinolínico la lesión se extendió 3.6 mm en sentido anteroposterior localizándose en los núcleos caudado y putamen, con extensión a áreas adyacentes tanto de tipo gabaérgico, como no gabaérgico. Las áreas extraestriatales afectadas fueron: corteza frontal parietal, claustrum, núcleo endopiriforme, globo pálido y áreas talámicas.

Volumen de ácido quinolínico de 1,2 μL (112.5 nmol/ μL)

La reducción del volumen de ácido quinolínico empleada a 1,2 μL se realizó con el objetivo de reducir el daño extraestriatal. Las características de la lesión para el volumen de 1,2 μL de ácido quinolínico se corresponden en general con las descritas en la primera etapa para 1,4 μL de ácido quinolínico, diferenciándose en la extensión de la lesión. En este caso la extensión anteroposterior promedio de la lesión fue de 3.0 mm y se observó menor afectación de las áreas extraestriatales, dañándose en algunos casos *claustrum*, núcleo endopiriforme, globos pálido, no así pálido ventral y las áreas talámicas.

Finalmente, se seleccionó el volumen de 1,2 μL de ácido quinolínico para lesionar el estriado, teniendo en cuenta la menor afectación de las áreas extraestriatales.

2. Células mononucleares de la médula ósea de rata para el trasplante en el modelo de lesión por ácido quinolínico

Obtención, aislamiento, marcaje y caracterización inmunofenotípica de las CMMO

El panel I de la Figura 7 muestra el estudio inmunocitoquímico, el cual permitió detectar de manera específica las proteínas de superficie celular en las CMMO. Las células fueron inmunopositivas para los marcadores (CD34; CD38; CD45 y CD90) (Fig. 7 C, D, E y F). En la Figura 7A, se muestra la suspensión de células marcadas con bisbenzimidida que fue utilizada en el trasplante; en todos los casos la viabilidad celular estuvo por encima del 97%. Para cada marcador se utilizó el correspondiente control negativo (Fig.7B). El panel II de la Figura 7 muestra el valor promedio del porcentaje de células positivas para cada uno de los antígenos de superficie celular, indicando la contribución que aporta cada marcador al porcentaje general dentro de la caracterización inmunofenotípica realizada: CD34= 19.33%, CD38=20.80%, CD45=17.27%, y CD90=23.52%. Este estudio demuestra la presencia de células portadoras de marcadores de células madre adultas en la médula ósea y la expresión de la heterogeneidad de los antígenos de superficie presentes en las células de interés.

La Figura 7. Muestra la caracterización inmunocitoquímica de células mononucleares de médula ósea utilizadas para el trasplante en el modelo de inyección por ácido quinolínico.

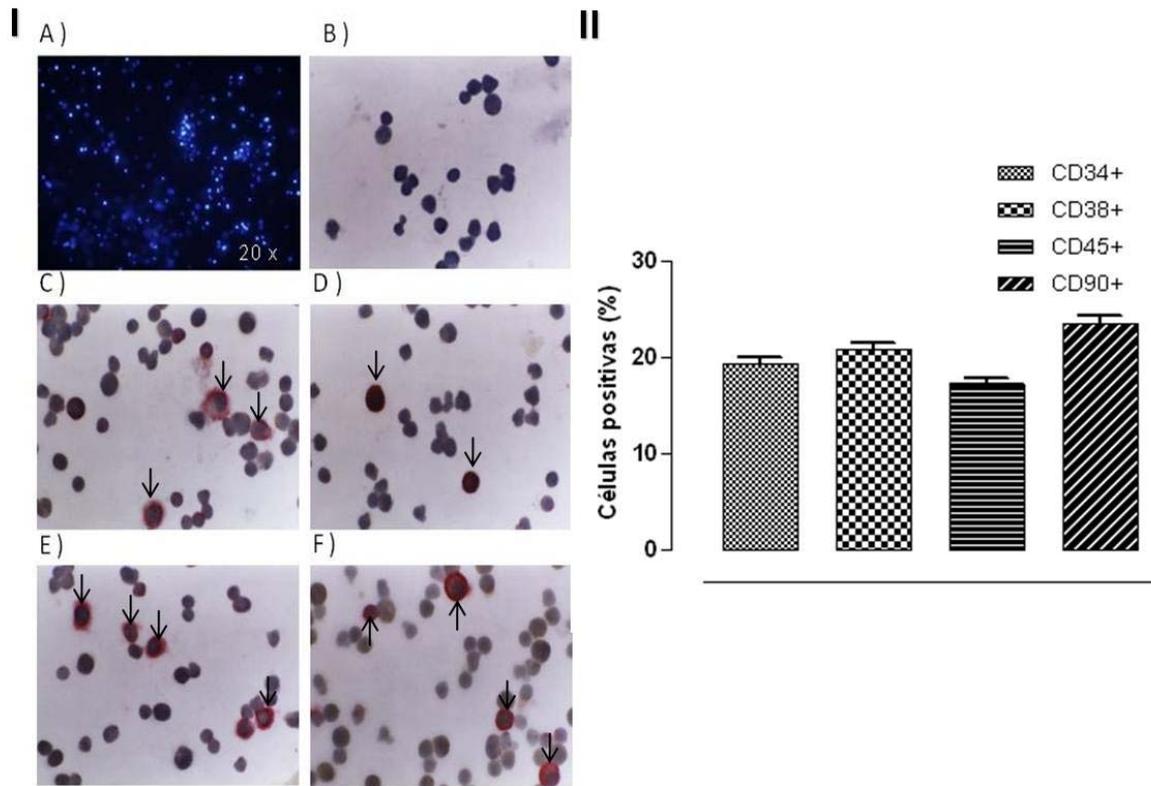


Figura 7. Caracterización inmunocitoquímica de células mononucleares de médula ósea (CMMO) utilizadas para el trasplante en el modelo de lesión por inyección de ácido quinolínico (AQ). **Panel I:** A) CMMO marcadas con bisbenzimidá, que muestra la alta viabilidad de las células; B) Control negativo (carece de anticuerpo primario), C) células CD34-positiva; (Dilución 1:40, DAKO) D) células CD38-positiva; (Dilución 1:200, DAKO) E) células CD45-positiva; (Dilución 1:50, DAKO) y F) células CD90-positiva; (Dilución 1:20, DAKO). **Panel II:** Se representa la media \pm la desviación estándar del porcentaje de células positivas para los marcadores CD34, CD38, CD45, y CD90.

3. Establecimiento de la concentración de CMMO para el trasplante

La Figura 8A representa un diagrama de un corte coronal del estriado con las coordenadas del trasplante. Para la concentración de 100 000 células totales (Fig. 8B), la observación al microscopio óptico de fluorescencia evidenció la supervivencia de las células trasplantadas las cuales mostraron un núcleo azul fluorescente. En general, las células se dispusieron linealmente en torno al área del trazo de la aguja de inyección, y se observó la unión en sentido vertical de los dos depósitos de inyección. Esta concentración favoreció que las células marcadas se distribuyeran en el tejido estriatal circundante sin que apareciera una disposición en halo que supusiera la muerte de las células

centrales. Además, hubo muy buena definición celular, sin que se formaran agregados o “paquetes” de células y fue muy baja la respuesta inflamatoria asociada al área de trasplante. Para las concentraciones de 200 000 (Fig. 8C) y 300 000 (Fig. 8D) células totales se apreció una respuesta inflamatoria abundante asociada al área del trasplante dado por la presencia de macrófagos dispuestos como un cordón a lo largo de esta área. Además existió muy poca definición de célula a célula, las cuales en ocasiones formaban agregados celulares.

La Figura 8 muestra el trasplante de CMMO en el estriado lesionado con ácido quinolínico con las concentraciones celulares utilizadas.

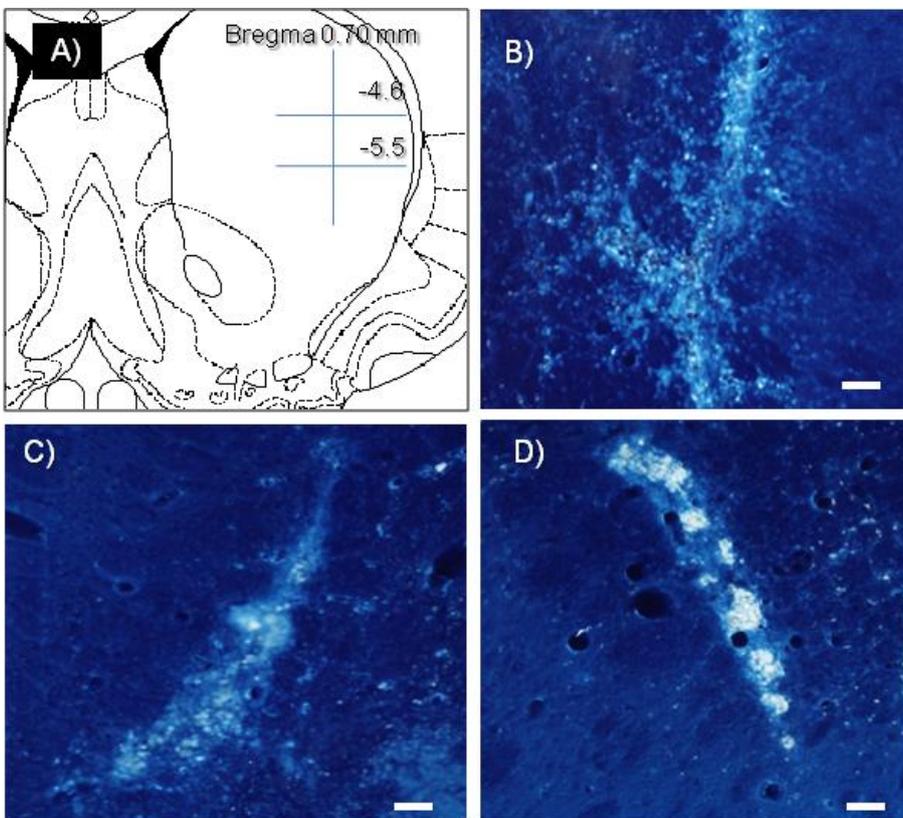


Figura 8. Trasplante de CMMO en el estriado lesionado con ácido quinolínico. A) Diagrama coronal que muestra las coordenadas del trasplante en el modelo de lesión con ácido quinolínico (G. Paxinos and C. Watson, 2006). B) Trasplante con una concentración de 100 000 células totales. C) Trasplante con una concentración de 200 000 células totales y D) Trasplante con una concentración de 300 000 células totales. Escala de barra (5 μ m).

4. Estudio de supervivencia de las CMMO

La Figura 9 muestra la suspensión de CMMO marcadas con bisbenzimidida que fue usada para evaluar la viabilidad de las células trasplantadas en diferentes tiempos después del trasplante. Las células mantuvieron una viabilidad por encima del 90%, lo que fue demostrado al realizar el conteo celular en cámara de Neubauer con solución de tripam azul. Al microscopio se pudo observar la presencia de células con núcleos brillantes (Fig. 9). El ajuste de la concentración celular final alcanzó un valor de 50×10^3 células/ μl .

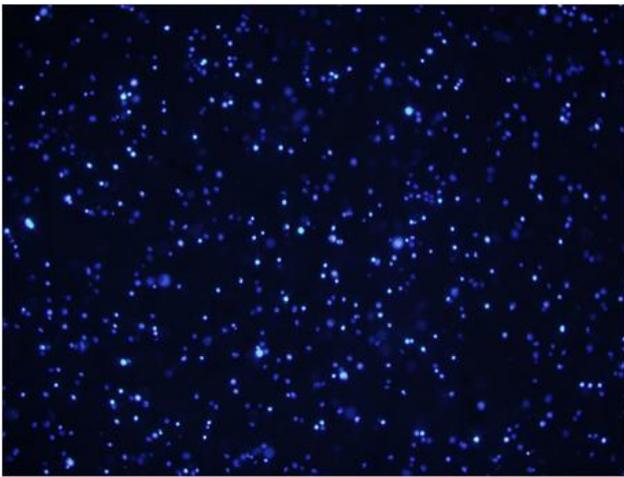


Figura 9. Células mononucleares de médula ósea marcadas con bisbenzimidida (Reactivo de Hoechst 33258, 20x), Estas células se trasplantaron en el estriado lesionado con ácido quinolínico. Las células viables son las portadoras de un núcleo fluorescente azul.

La Figura 10 muestra el estudio de la supervivencia de las células trasplantadas en el modelo de lesión con ácido quinolínico. Las células trasplantadas se analizaron en diferentes tiempos; desde 10 hasta 365 días después del trasplante. La Figura 10A muestra un diagrama modificado tomado del atlas de Watson y Paxinos representativo de un corte a nivel de la *comisura blanca anterior*, lugar de referencia para los cortes que se exponen. La Figura 10B muestra el estriado control. Las Figuras 10 de la C a la I muestran la presencia de las células trasplantadas en los diferentes tiempos analizados. Con este resultado se demuestra que las células trasplantadas en el estriado lesionado con ácido quinolínico tienen una supervivencia en el tejido hospedero por un período de hasta un año.

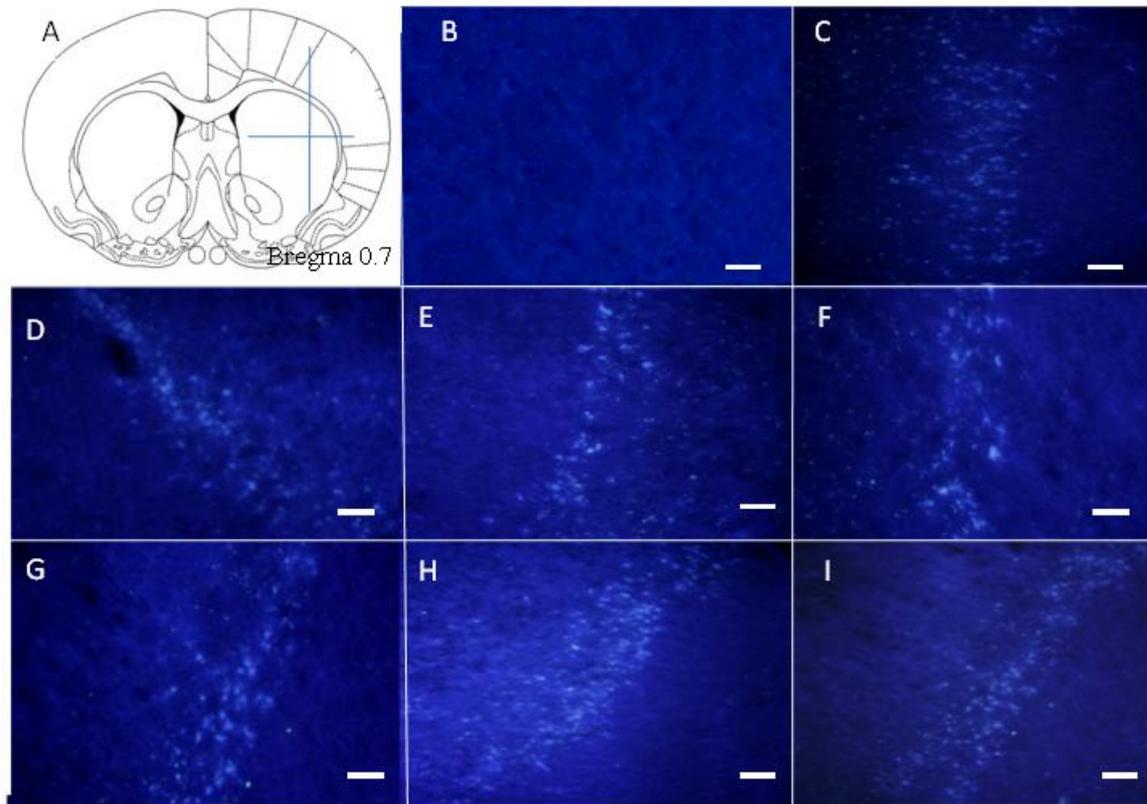


Figura 10. Estudio de supervivencia celular. Estriado trasplantado con células mononucleares de médula ósea (CMMO) marcadas con bisbenzimidá (reactivo de Hoechst 33258). A) Diagrama coronal que muestra la comisura blanca anterior (G. Paxinos and C. Watson, 1998) usada como referencia del nivel de corte. B) Estriado control. C), D), E), F), G), H) e I) representan el estriado de ratas sacrificadas 10, 30, 45, 60, 90, 180 y 365 días después del trasplante respectivamente. Escala de barra (25 μ m).

Pruebas conductuales

Actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

Durante la etapa de establecimiento de las condiciones para el trasplante de CMMO en el modelo de lesión con ácido quinolínico, 7 días después de la inyección intracerebral de esta neurotoxina y 30 días después de realizado el trasplante de CMMO se evaluó la conducta de giro que induce la D-anfetamina (5 mg/kg intraperitoneal) en todos los grupos experimentales, incluido el grupo control sano.

En el estudio pretrasplante la conducta de giro con D-anfetamina mostró un incremento significativo

($H_{(3,40)}=24,071$; $p < 0,05$) en el grupo de ratas de lesión con ácido quinolínico, en comparación con el grupo control sano (Fig.11A). La comparación de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en el estudio posterior al trasplante reveló diferencias entre los grupos experimentales ($H_{(3,40)}=29,011$; $p < 0,05$) (Fig.11B). Estas diferencias respondieron a una disminución significativa en el comportamiento de esta variable en el grupo de lesión con ácido quinolínico y trasplantado con CMMO (TpCMMO) con respecto a los grupos de lesión con ácido quinolínico (LAQ) y de lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo DMEM (TpDMEM). El grupo TpCMMO mostró valores de actividad rotatoria estadísticamente similares al grupo control sano.

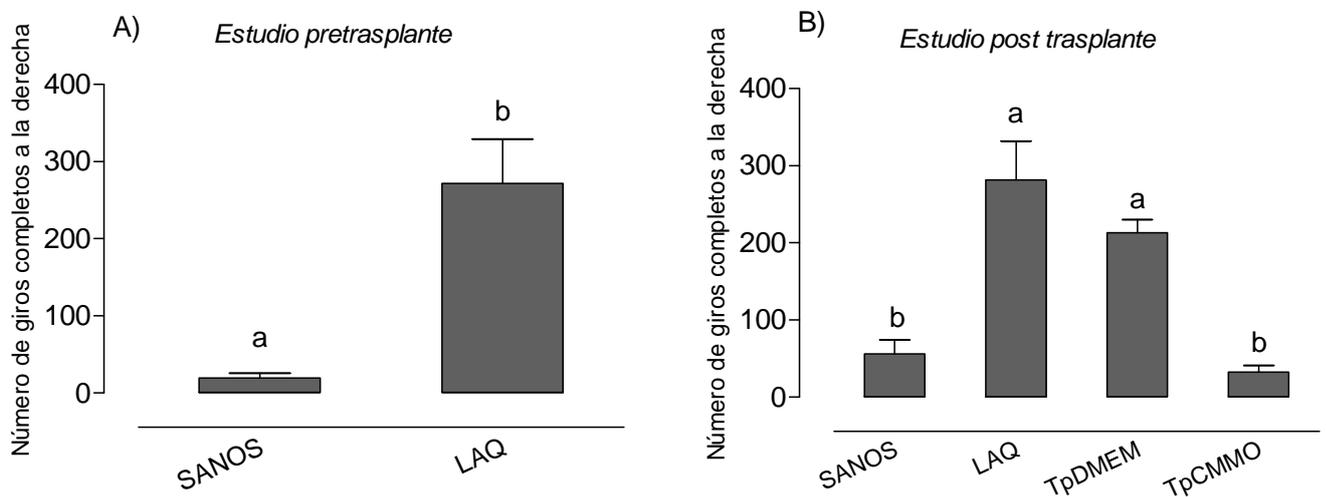


Figura 11. Actividad rotatoria inducida por D-Anfetamina antes y después del trasplante de CMMO entre los grupos experimentales. Letras diferentes indica la diferencia estadística significativa antes (Fig. 11A) y después (Fig. 11B) del trasplante de CMMO encontradas en el análisis de varianza no paramétrico (ANOVA) (prueba de Kruskal Wallis, $p < 0,05$), seguida de una prueba no paramétrica de comparación de rangos (Prueba de Dunn). (Ratas por grupo, $n=10$). Los datos expresan la media \pm error estándar de la media; (EEM). LAQ: lesión con ácido quinolínico; CMMO: células mononucleares de médula ósea; TpCMMO: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con CMMO; TpDMEM: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Por otra parte la comparación de esta variable dentro del grupo de lesión con ácido quinolínico y trasplantado con CMMO, antes y después del trasplante, reveló una disminución estadísticamente significativa en el comportamiento de la misma ($Z_{(1,20)}=2,803$; $p < 0,05$) después del trasplante (Fig.12).

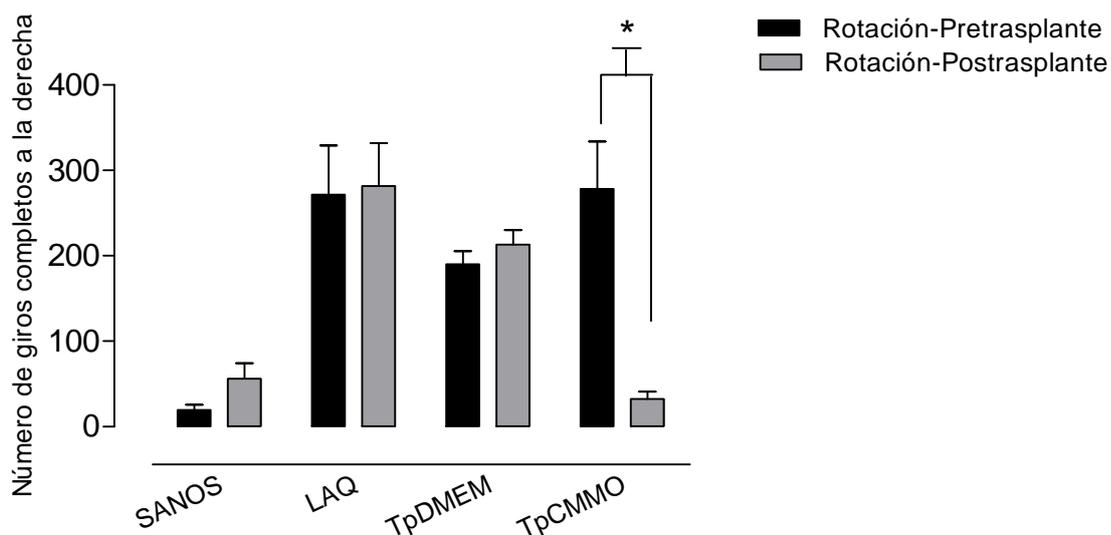


Figura 12. Actividad rotatoria inducida por D-Anfetamina antes y después del trasplante de CMMO dentro de cada grupo experimental, (ratas por grupo, n=10). El asterisco indica la diferencia estadística significativa antes y después del trasplante de CMMO en el análisis de comparación de medias después de utilizar la prueba de Wilcoxon para datos pareados ($p < 0.05$). Los datos expresan la media \pm error estándar de la media; (EEM). LAQ: lesión con ácido quinolínico; CMMO: células mononucleares de médula ósea; TpCMMO: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con CMMO; TpDMEM: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Prueba de las habilidades motoras de las extremidades anteriores

En el estudio pretrasplante se evidenció que el grupo de lesión con ácido quinolínico dejó un número significativamente mayor de alimentos residuales con respecto al grupo control sano para ambas extremidades anteriores [Extremidad anterior derecha: ($H_{(3,40)}=24,301$; $p < 0,05$); Extremidad anterior izquierda: ($H_{(3,40)}=21,442$; $p < 0,05$)]; (Fig.13A y Fig.13B, respectivamente).

En la etapa postrasplante, las habilidades motoras de las extremidades anteriores mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales para ambas extremidades [Extremidad anterior derecha: ($H_{(3,40)}=26,719$; $p < 0,05$); Extremidad anterior izquierda: ($H_{(3,40)}=26,827$; $p < 0,05$)]; (Fig.13C y Fig.13D, respectivamente). Estas diferencias obedecieron a que el grupo con trasplante de CMMO dejó un número significativamente menor de alimentos residuales en la escalerilla de la caja experimental con respecto a los grupos de lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo DMEM. No se apreciaron diferencias significativas entre el número de

alimentos residuales dejados por el grupo de trasplante de CMMO y el grupo control sano.

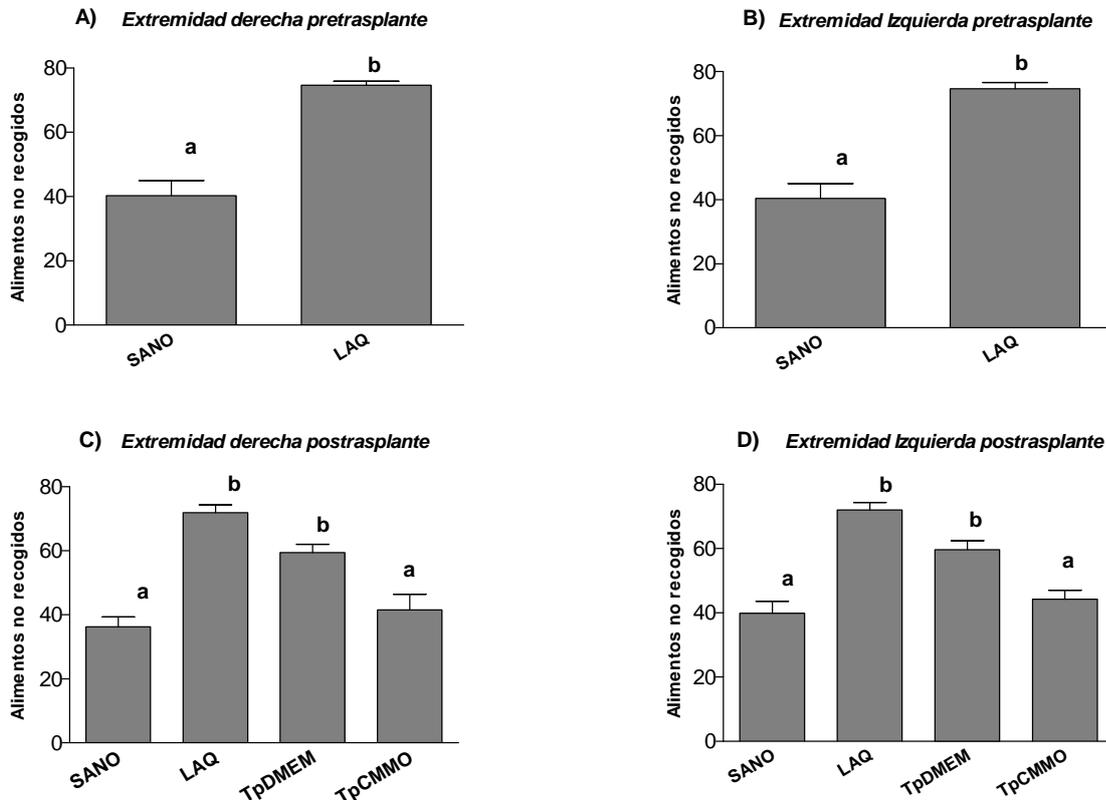


Figura 13. Evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores. Derecha (Fig.13 A y C) e izquierda (Fig.13 B y D) antes y después del trasplante de CMMO. Las letras en la parte superior de gráfico indican la diferencia estadística significativa entre los grupos en el análisis de varianza no paramétrico (ANOVA) (prueba de Kruskal Wallis, $p < 0,05$), seguido de una prueba de comparación de rangos (Prueba de Dunn). Los datos son expresados como la media \pm EEM (ratas por grupo, $n=10$). LAQ: ratas lesionadas con ácido quinolínico; TpCMMO: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantados con CMMO; TpDMEM: ratas lesionados con ácido quinolínico y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Por su parte, la comparación sólo dentro del grupo de ratas con lesión de ácido quinolínico y trasplante de CMMO antes y después del trasplante reveló una disminución significativa del número de alimentos residuales dejados por la ratas después del trasplante de CMMO en ambas extremidades anteriores [Wilcoxon, Extremidad anterior derecha: ($Z_{(1,20)}=2,665$; $p < 0,05$); Extremidad anterior izquierda: ($Z_{(1,20)}=2,803$; $p < 0,05$)], (Fig. 14 A y B).

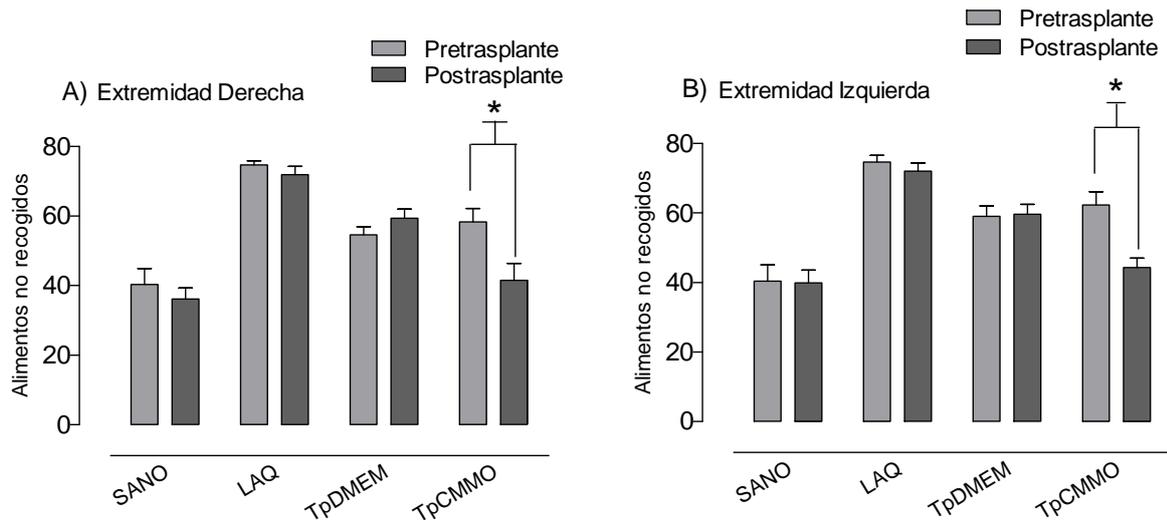


Figura 14. Evaluación de las habilidades motoras de la extremidad anterior derecha (Fig. 14A) e izquierda (Fig. 14B) antes y después del trasplante de CMMO en cada grupo experimental. El asterisco indica la diferencia estadística significativa antes y después del trasplante de CMMO en el análisis de comparación de medias después de utilizar la prueba de Wilcoxon para datos pareados ($p < 0.05$). Los datos son expresados como la media \pm EEM (ratas por grupo, $n=10$). LAQ: ratas lesionadas con ácido quinolínico; TpCMMO: ratas lesionadas con AQ y trasplantadas con células mononucleares de médula ósea; TpDMEM: ratas lesionadas con AQ y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Las pruebas conductuales descritas hasta aquí fueron utilizadas en la etapa de estandarización del modelo de lesión con ácido quinolínico y el trasplante de CMMO. Para la etapa de evaluación funcional del trasplante de CMMO se utilizó un conjunto de pruebas conductuales que incluyó ensayos de evaluación motora y cognoscitiva cuyos resultados se describen a continuación.

Prueba de la Barra Transversal

La prueba de la barra transversal evalúa el equilibrio y la coordinación motora de la rata cuando disminuye la superficie de apoyo. Este paradigma conductual se evaluó 30 días después del trasplante de CMMO. El ANOVA bifactorial (Grupos x Barras) reveló que ambos factores tienen influencia significativa sobre la distancia recorrida por el sujeto experimental en la barra.

La comparación entre grupos reveló una disminución significativa de la distancia recorrida por las ratas a medida que se incrementa la dificultad de la tarea motora ($F_{(3,167)}=8.52$, $p < 0.05$). En este

sentido el grupo de ratas sanas mostró las mayores distancias recorridas y los grupos de lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo DMEM mostraron las menores distancias. El grupo de trasplante de CMMO presentó un comportamiento intermedio, sin diferir estadísticamente ni del grupo de lesión con ácido quinolínico ni del grupo sano (Fig.15).

Por su parte la comparación entre BARRAS reveló diferencias significativas con menores distancias recorridas por las ratas en las barras con forma circular ($F_{(3,167)}=6.16$, $p<0.001$). La interacción entre ambos factores (GRUPOxBARRA), reveló diferencias significativas ($F_{(9,167)}=5.58$, $p<0.001$) entre el grupo control y los grupos lesionados en todas las condiciones excepto en la barra cuadrada grande (Fig.15).

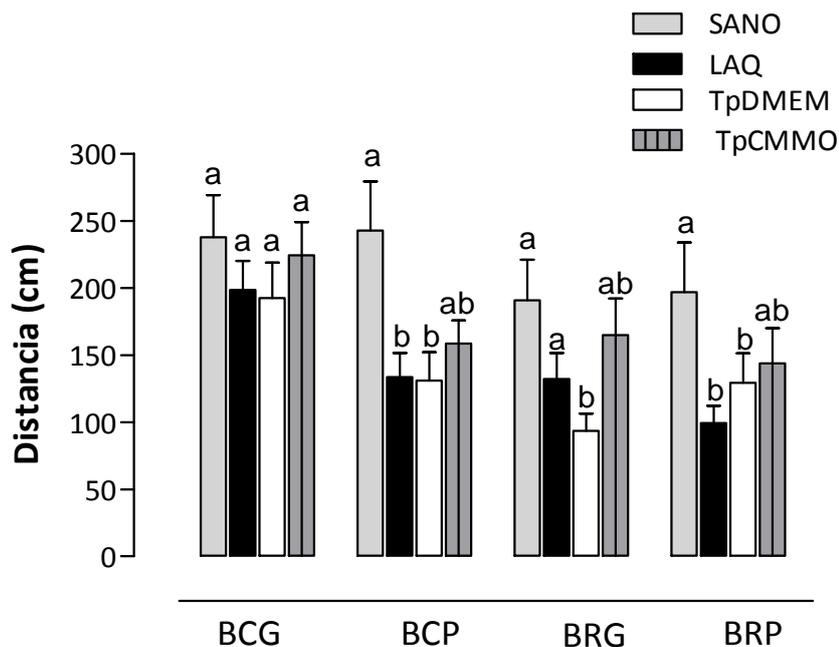


Figura 15. Prueba de la barra transversal. La prueba incluyó cuatro tipos diferentes de barras: barra cuadrada grande (BCG); barra cuadrada pequeña (BCP); barra redonda grande (BRG); barra redonda pequeña (BRP). El gráfico representa la distancia recorrida sobre cada barra entre los diferentes grupos experimentales. Las letras diferentes en la parte superior del gráfico corresponden a diferencias estadísticas entre los grupos en el análisis de comparación de medias después del ANOVA bifactorial (Prueba de Tukey, $p<0.05$). Los datos son expresados como la media \pm EEM (ratas por grupo, $n=10$). LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpCMMO: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con células mononucleares de médula ósea. TpDMEM: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Prueba de Reconocimiento de Objetos

Esta prueba cognoscitiva esta basada en la tendencia espontánea de los animales a pasar más tiempo explorando un objeto nuevo que uno que le resulta familiar. Este paradigma conductual se evaluó 30 días después del trasplante de CMMO. En el primer día de ejecución todos los grupos emplearon un tiempo estadísticamente similar en explorar los dos objetos presentados (Fig.16A), los cuales eran idénticos ($F_{(3,4)}=0,91969$, $p>0.05$). Sin embargo, se pudo apreciar una tendencia a que las ratas lesionadas emplearan menos tiempo en explorar los objetos en comparación con los controles. Las ratas trasplantadas con CMMO y las tratadas con vehículo DMEM mostraron un tiempo de exploración estadísticamente similar a la de los controles. En el segundo día de la prueba (Fig.16B) se apreciaron diferencias significativas entre grupos en el tiempo de exploración del nuevo objeto ($F_{(3,41)}=4,84746$, $p<0.05$). Estas diferencias están relacionadas con una disminución significativa del tiempo de exploración en el grupo de lesión con ácido quinolínico ($F_{(3,172)}=9,9042$, $p<0.05$) con respecto al grupo control sano y trasplantado con CMMO. Los animales tratados con vehículo (DMEM) mostraron cierto grado de recuperación en el reconocimiento del nuevo objeto.

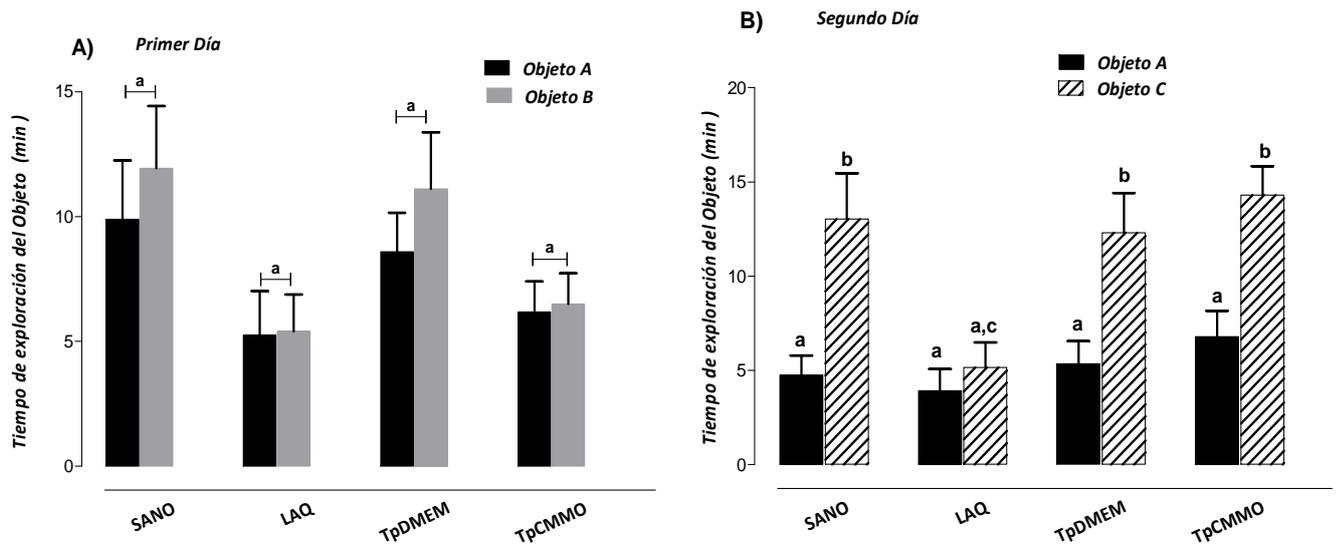


Figura 16. Prueba de reconocimiento de objetos. En el primer día de la prueba (A) los sujetos experimentales fueron presentados a dos objetos similares en tamaño, forma y color. En el segundo día de la prueba (B) los sujetos experimentales fueron presentados a un objeto familiar unido a un objeto nuevo, diferente en tamaño, forma y color. Los datos son expresados como la media \pm EEM (ratas por grupo, $n=10$). Las diferencias estadísticas entre los grupos corresponden con el análisis de comparación de medias después del ANOVA bifactorial (Prueba de Tukey, $p<0.05$). LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpCMMO: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con células mononucleares de médula ósea. TpDMEM: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Laberinto Acuático de Morris

La Figura 17 muestra los resultados de la prueba de memoria espacial, que fue realizada 30 días después del trasplante de CMMO. La latencia de escape mostró una reducción progresiva siguiendo un comportamiento que describe una curva asintótica en todos los grupos experimentales sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos durante la prueba de adquisición ($F_{(18,252)}=1,1091$, $p=0,34339$) (Fig. 17A). Sin embargo, en la prueba de retención (Fig. 17B) se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3,42)}=9,1577$, $p<0.001$) entre el grupo lesionado y trasplantado con vehículo (DMEM), cuando fueron comparados con el grupo control y trasplantado con CMMO.

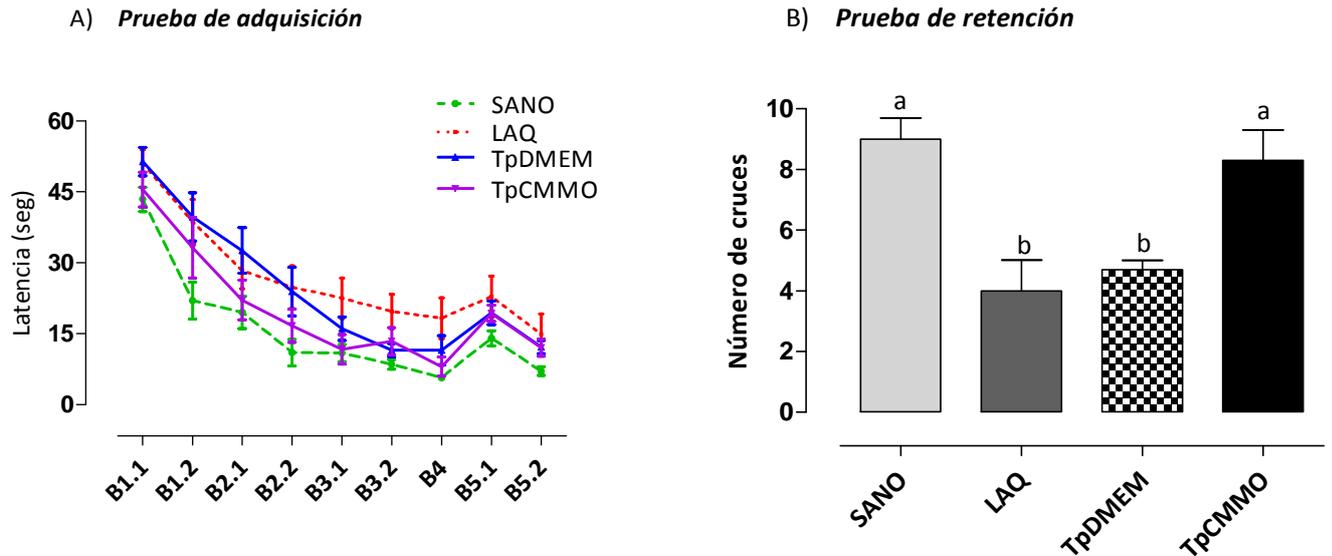


Figura 17. Prueba del laberinto acuático de Morris. A) Efectos del trasplante de CMMO en el ensayo de adquisición (con plataforma). B) Efectos del trasplante de CMMO en el ensayo de retención (sin plataforma). Los datos son expresados como la media \pm EEM (ratas por grupo, $n=10$). Las diferencias estadísticas entre los grupos corresponden con el análisis de comparación de medias después del ANOVA bifactorial (prueba de Tukey, $p < 0.05$). B: bloques de latencia por día. LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpCMMO: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con células mononucleares de médula ósea. TpDMEM: ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con vehículo (DMEM).

Estudios moleculares

Expresión génica de *BDNF* por RT-PCR

La Figura 18 muestra el efecto del trasplante de células mononucleares de médula ósea sobre la expresión del *bdnf* en la corteza cerebral y el estriado que se midió 30 días después del trasplante de CMMO, por RT-PCR en todos los grupos experimentales. Un ANOVA bifactorial demostró que el factor GRUPO tiene una influencia significativa ($F_{(3,24)}=4,2921$, $p \leq 0.05$) en el porcentaje de expresión de *bdnf* tanto en la corteza cerebral como en el estriado. En la corteza cerebral el porcentaje de expresión de *bdnf* evidenció un aumento significativo en el grupo de trasplante de CMMO con respecto a los restantes grupos ($p \leq 0.05$). Por su parte en el estriado el grupo trasplantado con CMMO mostró diferencias significativas con respecto a los grupos lesionados ($p \leq 0.05$), manteniendo un comportamiento estadísticamente similar al grupo control.

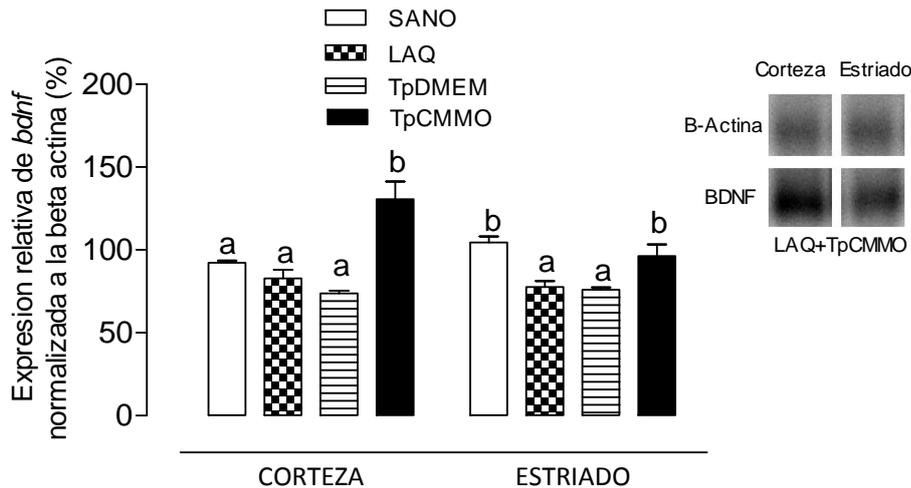


Figura 18. Efecto del trasplante de células mononucleares de médula ósea (CMMO) sobre la expresión génica del factor neurotrófico derivado del cerebro (*bdnf*) en la corteza cerebral y el estriado, expresada como porcentaje de β -actina. Las letras en la parte superior del gráfico corresponden a las diferencias estadísticas entre los grupos detectadas en el análisis ANOVA bifactorial (Prueba de Tukey, $p < 0,05$). A la derecha se muestra el estudio electroforético para el grupo de trasplante de CMMO. LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpCMMO: lesión con ácido quinolínico y trasplante de células mononucleares de médula ósea. TpDMEM: lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo (DMEM).

Cuantificación de la proteína de BDNF por Ensayo Inmuno Enzimático

La Figura 19 muestra el efecto del trasplante de células mononucleares de médula ósea sobre las concentraciones del BDNF en la corteza cerebral y el estriado, las que fueron evaluadas 30 días después del trasplante de CMMO. El ANOVA trifactorial (Grupo, Estructura y Lado) demostró que existen diferencias significativas entre ambos hemisferios ($F_{(1,113)}=6.2568$, $p \leq 0.05$), entre grupos experimentales ($F_{(4,113)}=103.1874$, $p \leq 0.05$); y no entre las estructuras estudiadas, corteza cerebral y estriado ($F_{(1,113)}=0.5763$, $p > 0.05$). No se observaron interacciones significativas entre estos tres factores, ni considerados en pares ni en conjunto ($F_{(1,113)}=0.8995$, $p > 0.05$). Las diferencias entre lados, resultaron esperadas dada la naturaleza unilateral del modelo que trabajamos. En relación con las diferencias entre los grupos experimentales, el estudio demostró que la lesión con ácido quinolínico, redujo significativamente las concentraciones de BDNF en ambas estructuras de interés (Fig. 19). La inyección con vehículo (DMEM) no modificó de forma significativa estos valores, sin embargo, el trasplante de CMMO indujo una recuperación de los niveles de BDNF hasta ser

similares al grupo sano y estadísticamente diferente de los grupos con lesión sin trasplante de CMMO. Este comportamiento se apreció tanto en la corteza cerebral (Fig. 19A) como en el estriado (Fig.19B).

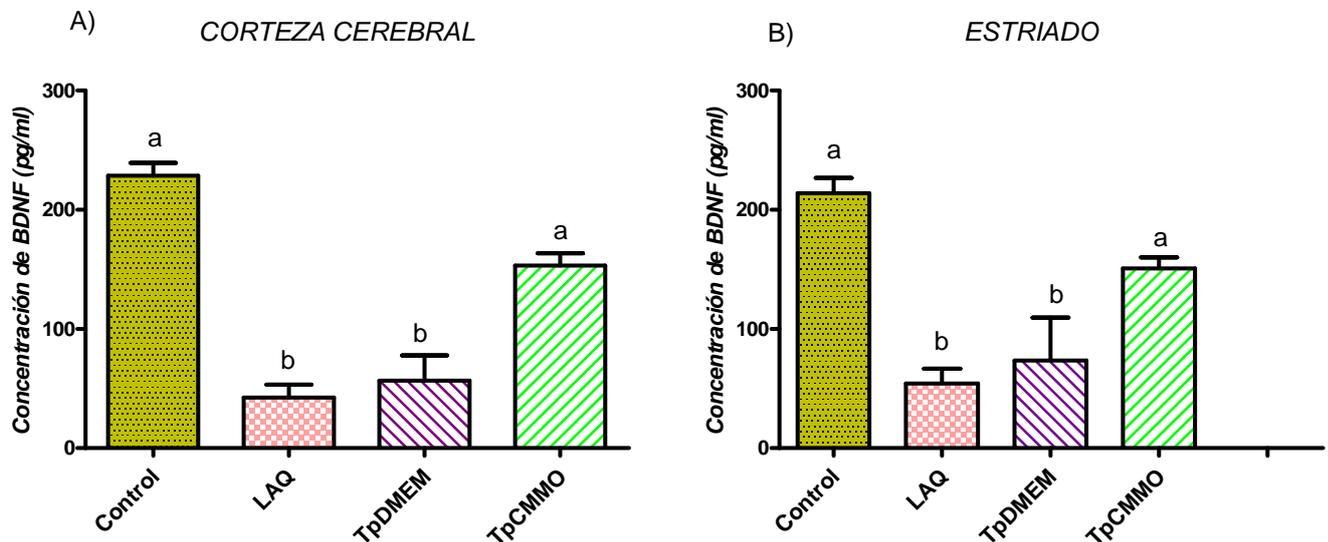


Figura 19. Efecto del trasplante de células mononucleares de médula ósea sobre las concentraciones del factor neurotrófico derivado del cerebro (*del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF*) en muestras de tejido cerebral de ratas. (A) Corteza cerebral y (B) Estriado. Las letras en la parte superior del gráfico corresponden a las diferencias estadísticas entre los grupos detectadas en el análisis ANOVA trifactorial (Prueba de Tukey, $p < 0,05$). Los datos expresan la media \pm error estándar de la media; (EEM). Letras comunes: indican que no hay diferencias significativas; letras diferentes indican diferencias significativas. LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpCMMO: lesión con ácido quinolínico y trasplante de células mononucleares de médula ósea. TpDMEM: lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo (DMEM).

Estudios morfológicos

ESTUDIO HISTOLÓGICO

Cresil Violeta

En la Figura 20 se muestra un corte coronal de estriado que permitió la inspección general de la morfología de esta estructura en diferentes condiciones usando la coloración de cresil violeta. La Figura 20A muestra la distribución normal de las células en esta región. La lesión con ácido

quinolínico redujo drásticamente la densidad celular (Fig.20B), situación que permanece sin cambios después de la inyección del vehículo (DMEM) (Fig.20C). En el grupo de trasplante con CMMO en el estriado (Fig.20D) la distribución celular es similar a la observada en el estriado del grupo control sano.

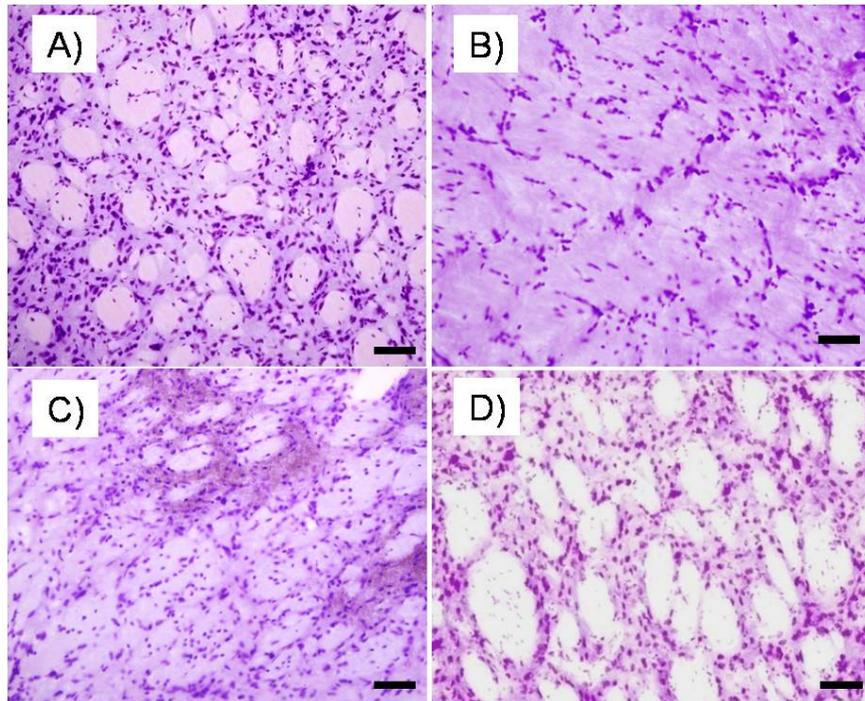


Figura 20. Distribución de células en el estriado con coloración básica de cresil violeta. El corte coronal del estriado derecho (20x), muestra la citoarquitectura general del estriado de ratas lesionadas con ácido quinolínico y trasplantadas con células mononucleares de médula ósea. A) estriado sano, B) estriado lesionado con ácido quinolínico, con pérdida neuronal C) estriado lesionado con ácido quinolínico e inyección del vehículo (DMEM), que constituye el grupo control del trasplante con signos de daño neuronal. D) estriado derecho lesionado con ácido quinolínico y trasplante de células mononucleares de médula ósea (CMMO), con una estructura semejante a la observada en el estriado sano. Escala de barra (25 μ m).

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Marcador glial: Glial Fibrillar Acid Protein (GFAP)

GFAP + Fluoro Jade-C (FJC)+ DAPI

El estudio inmunohistoquímico se realizó 2 meses después del trasplante de CMMO o medio de cultivo DMEM. El resultado mostró una intensa reactividad para la GFAP, determinado por un

aumento de la gliosis astrocítica en el estriado de los grupos lesionados con ácido quinolínico y trasplantados con vehículo (DMEM) (Fig.21A). Es notable que estos grupos mostraran ser positivos para el fluorojade C, que marca de forma selectiva neuronas en degeneración. La inmunopositividad para la GFAP fue menos intensa o nula en el estriado del grupo sano y en el grupo de trasplante de CMMO, que interesantemente mostró ser negativo para el Fluorojade C. Las ratas lesionadas con ácido quinolínico y las trasplantadas con el vehículo DMEM mostraron evidencia de una intensa degeneración, que no fue corroborada en los sujetos sanos ni en los trasplantados con CMMO. La coloración con DAPI fue utilizada para marcar todos los núcleos celulares independientemente del tipo celular que se tratara, dada su habilidad de integrarse al ADN del núcleo de todas las células en general. En el panel unido a la derecha, para los grupos lesionados con ácido quinolínico se muestra una mayor coexpresión de los núcleos con GFAP, DAPI y el Fluorojade C. En la Figura 21B se muestra un aumento estadísticamente significativo ($F_{(3,96)}=49,468$, $p \leq 0.05$); de la densidad de astrocitos en los grupos lesionados con ácido quinolínico y trasplantados con vehículo (DMEM) cuando se comparan con el grupo control sano y el grupo trasplantado con CMMO (Fig.21B).

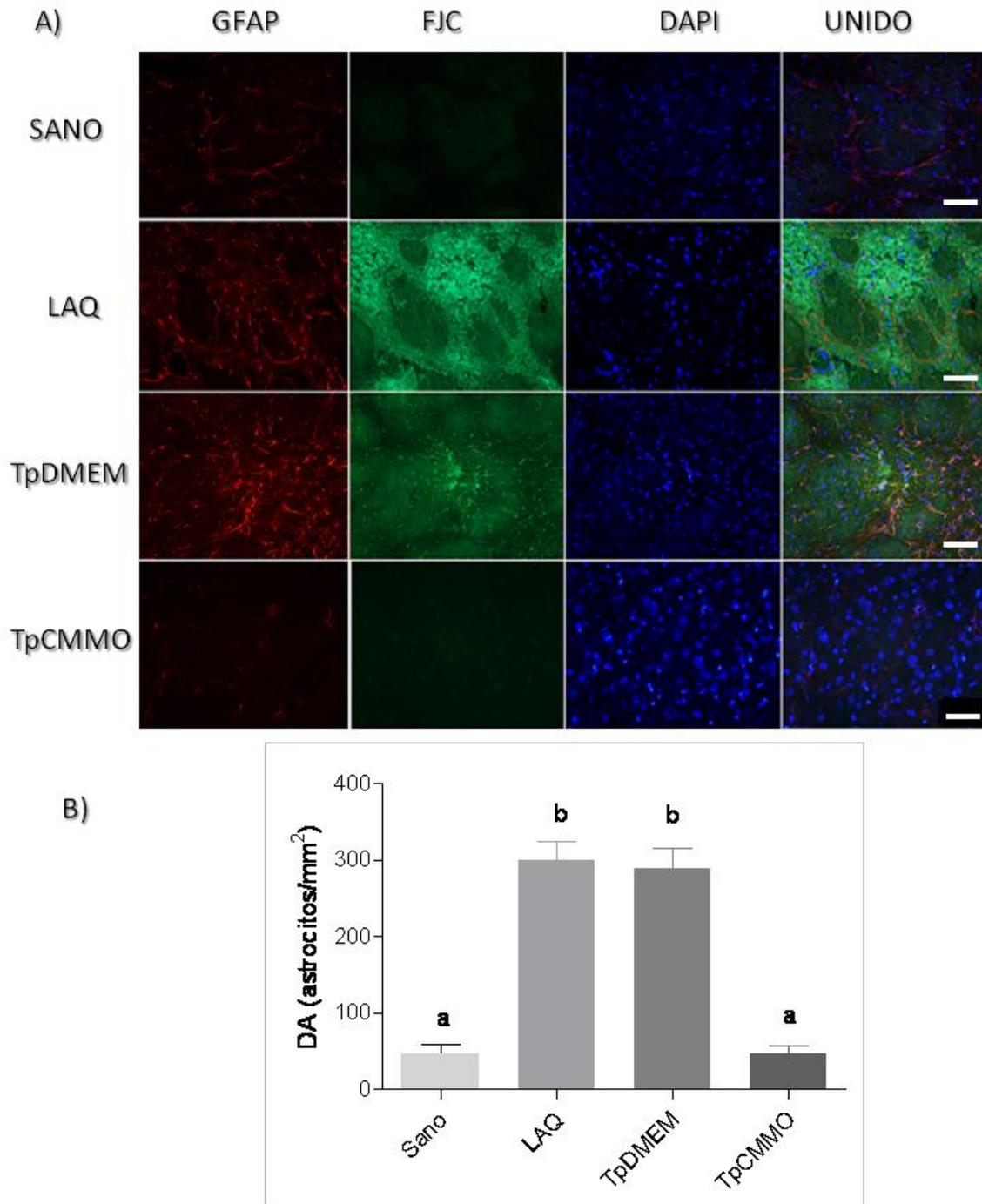


Figura 21. Inmunohistoquímica para GFAP, Fluorojade C y DAPI. A) Las imágenes muestran una intensa reactividad para la GFAP y positividad para el Fluorojade-C en los grupos de lesión con ácido quinolínico cuando se comparan con el grupo sano y trasplantado con CMMO. Aparecen los núcleos fluorescentes azules con coloración DAPI y en el panel unido se muestra la superposición de los núcleos con el marcador GFAP señalando el sitio de degeneración celular. B) La gráfica muestra la densidad de astrocitos por mm^2 . Las letras en la parte superior del gráfico corresponden a las diferencias estadísticas entre los grupos detectadas en el análisis ANOVA (Prueba de Tukey, $p < 0,05$). LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpCMMO: lesión con ácido quinolínico y trasplante de células mononucleares de médula ósea. TpDMEM: lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo (DMEM). Escala de barra (40 μm).

Marcador Neuronal: Neuronal Nucleous (NeuN)

NeuN + Fluoro Jade-C (FJC)+ DAPI

La determinación del marcador neuronal NeuN, mostró reactividad positiva en los grupos sano y de trasplante con CMMO (Fig. 22A). En contraste, estos grupos se mostraron negativos para la coloración con Fluor Jade C. El grupo de lesión con ácido quinolínico y el grupo trasplantado con vehículo DMEM no mostraron reactividad para el marcador NeuN, lo que indica una disminución en el número de neuronas y por consiguiente la ocurrencia de muerte neuronal. Este resultado se complementa con la presencia de inmunopositividad a Fluor Jade C en estos dos grupos experimentales. En el panel unido a la derecha con coloración DAPI, se muestra una mayor presencia de cuerpos neuronales positivos a la superposición del NeuN en los grupos sano y trasplantado con vehículo DMEM, sugiriendo la presencia de células que pudieran diferenciarse a un fenotipo neural. En la Figura 22B se muestra un aumento estadísticamente significativo ($F_{(3,95)}=313.05$, $p \leq 0.05$); de la densidad neuronal en el grupo trasplantado con CMMO cuando se compara con los grupos lesionados con ácido quinolínico y trasplantado con vehículo DMEM, manteniendo un comportamiento estadísticamente similar al grupo control sano (Fig.22B).

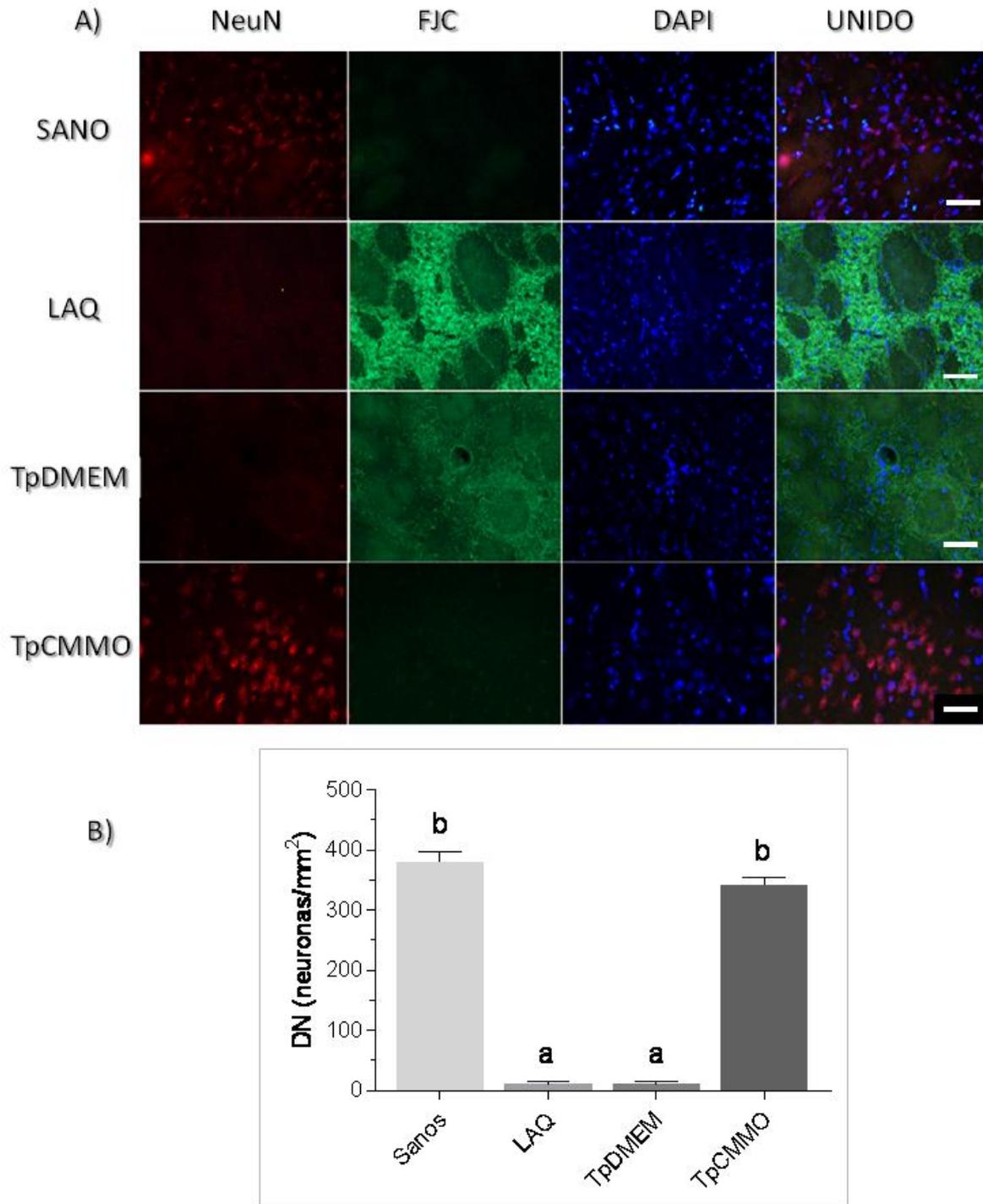


Figura 22. Inmunohistoquímica para NeuN, Fluorojade C y DAPI. A) Las imágenes muestran una reactividad positiva en los grupos control y de trasplante con CMMO para el marcador NeuN, y negatividad para el colorante Fluorojade C, cuando se comparan con los grupos de lesión. B) La gráfica en B muestra la densidad de neuronas por mm². Las letras en la parte superior del gráfico corresponden a las diferencias estadísticas entre los grupos detectadas en el análisis ANOVA (Prueba de Tukey, $p < 0,05$). LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpDMEM: lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo (DMEM). TpCMMO: lesión con ácido quinolínico y trasplante de células mononucleares de medula ósea. Escala de barra (40 μ m).

Marcador gabaérgico: Descarboxilasa del Ácido Glutámico (GAD)**Descarboxilasa del Ácido Glutámico**

El estudio inmunohistoquímico para la GAD, marcador de neuronas gabaérgicas, mostró reactividad positiva en el grupo control sano y el grupo de trasplante con CMMO (Fig. 23). Los grupos de lesión con ácido quinolínico y el grupo trasplantado con vehículo DMEM no mostraron reactividad para el marcador GAD, indicando en ellos la pérdida de neuronas gabaérgicas de talla mediana en el estriado lesionado con ácido quinolínico (Fig. 23).

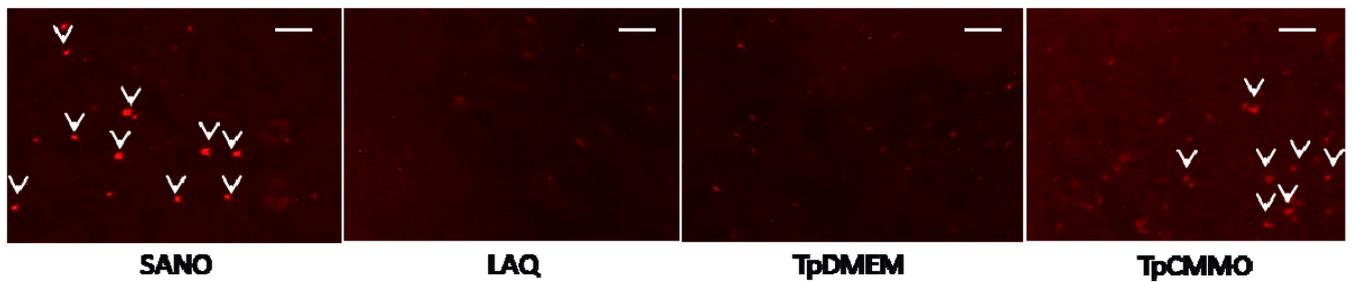


Figura 23. Efectos del trasplante de CMMO sobre la pérdida de neuronas gabaérgicas estriatales, estudiadas con Inmunohistoquímica para GAD, (20x). CMMO: células mononucleares de médula ósea. LAQ: lesión con ácido quinolínico. TpDMEM: lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo (DMEM). TpCMMO: lesión con ácido quinolínico y trasplante de células mononucleares de medula ósea. Escala de barra (20 mcm).

DISCUSIÓN

1. Implementación del modelo de enfermedad de Huntington

La infusión intracerebral de ácido quinolínico produce cambios morfológicos y bioquímicos en las ratas que remedan lo observado en los cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington, es por ello que, en la búsqueda de modelos para el estudio de esta enfermedad, se haya planteado la hipótesis de que esta neurotoxina interviene en su patogenia (126). La lesión tisular producida por el ácido quinolínico, constituye el mejor modelo de toxicidad del glutamato que se conoce hasta el presente (54). Este hecho se atribuye al tipo de daño neuronal que produce el ácido quinolínico, ya que provoca una lesión selectiva de las neuronas gabaérgicas de talla media, así como una disminución significativa de las concentraciones de GABA, sustancia P, somatostatina y neuropéptido Y (126;208). Cuando se inyecta ácido quinolínico en el parénquima cerebral, su difusión produce un gradiente de lesión en el que se definen tres áreas: una inmediatamente alrededor de la inyección que se caracteriza por gliosis intensa, y depleción indiscriminada de todas las neuronas (126;209), seguida de un área de gliosis con pérdida neuronal parcial, que constituye una zona de transición, y periféricamente una región en la cual las neuronas aparecen sin ningún daño (132).

1. Modelo de lesión

En la fase inicial de nuestro experimento se utilizaron dos volúmenes diferentes de ácido quinolínico, para lesionar el estriado: 1,4 μL y 1,2 μL . Los dos volúmenes se trabajaron a una concentración de ácido quinolínico de 112.5 nmol/ μL , lo que se encuentra en el rango reportado en la literatura (210;211). Ambos volúmenes provocaron pérdidas neuronales que abarcaron, aunque no en su totalidad, una gran parte del estriado. En nuestro estudio se corroboró que la lesión estriatal con ácido quinolínico induce una marcada degeneración neuronal en el estriado, acompañado por una gliosis de grado variable en dependencia del volumen de ácido quinolínico utilizado, que pudo ser evidenciada por la pérdida de la imagen definida en parches de esta estructura y por la alta reactividad en la expresión de la GFAP. En las ratas lesionadas con ácido quinolínico esta marcada gliosis aparece no solo en el estriado, sino también en otras áreas muy similares a las que se reportan en la literatura, como la amígdala, septum, hipotálamo, y el globo pálido entre otras (126). Este hecho también se reporta por otros autores (212), que describen además hipertrofia e hiperplasia de las microglías y los astrocitos, unido a la pérdida

neuronal (213).

Para las siguientes etapas de nuestro estudio, se seleccionó el volumen de 1,2 μ L. Se escogió este volumen de ácido quinolínico teniendo en cuenta que con el se induce una lesión en el núcleo estriado, similar en amplitud a la observada con el volumen de 1,4 μ L, pero con una menor afectación de los tejidos vecinos. La efectividad de la lesión con ácido quinolínico pudo ser evaluada a través de los estudios conductuales realizados que demostraron un aumento significativo de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina en correspondencia con las ratas que mostraron mayor extensión de la lesión estriatal.

En conclusión, los estudios iniciales para introducir un modelo de enfermedad de Huntington mostraron que la inyección de ácido quinolínico (volumen: 1,2 μ l) fue capaz de provocar una lesión del estriado análoga a la que produce la enfermedad, con una menor afectación de estructuras extraestriatales, debido a que en este volumen la cantidad de ácido quinolínico fue menor.

2. CMMO de rata para el trasplante en el modelo de lesión por ácido quinolínico

Obtención, aislamiento, marcaje y caracterización inmunofenotípica de las CMMO

La médula ósea es una fuente importante de células mononucleares que pueden ser utilizadas con un alto grado de confiabilidad para el trasplante celular en aquellas enfermedades donde se haya demostrado que ellas juegan un papel fundamental en la regeneración del tejido dañado. Estas células constituyen una fuente alternativa para ser empleadas en el trasplante de pacientes con enfermedades neurológicas. En nuestro estudio las CMMO fueron obtenidas, aisladas y marcadas con bisbenzimidazoles, utilizando métodos sencillos, lo cual indica que existe una forma de acceder a ellas relativamente fácil. La muestra de médula ósea obtenida directamente del fémur de las extremidades traseras de la rata, contiene las células mononucleares.

Existen marcadores de superficie específicos que caracterizan a la población de las células de la médula ósea. Estas células pueden expresar un espectro de marcadores de etapas tempranas y otros que están sujetos al estado de diferenciación celular; los antígenos de superficie aparecen y desaparecen en un período determinado del desarrollo evolutivo, lo que hace que su inmunofenotipo sea mucho más complejo (214;215). En este trabajo se evidenció porcentajes de células positivas para los marcadores

CD34, CD38, CD45 y CD90, que se encuentran en el rango de lo reportado por otros autores (214;215). El hecho de que no todas las células hayan sido portadoras del mismo marcador, indica la existencia de líneas celulares diferentes, que están formando parte de la muestra en estudio. Esta heterogeneidad celular explicaría la positividad para diferentes marcadores lo cual no difiere con lo reportado por otros autores (216-220).

Durante varios años se consideró que las células madre hematopoyéticas eran las únicas células de la médula ósea con capacidad regenerativa. Sin embargo, hoy se sabe que la composición de la médula ósea es diversa, ya que se ha identificado un grupo heterogéneo de células madre adultas que incluyen además de las hematopoyéticas y mesenquimales, la denominada población lateral (221), y las células progenitoras adultas multipotentes, entre otras (222). Nuestro estudio apoya el concepto actual de la diversidad de las poblaciones de células madre adultas existentes en la médula ósea, pues la identificación de los antígenos CD34, CD38, CD45, y CD90 fue posible en todos los casos, y los mismos representan subclases de poblaciones existentes, en diferentes estadios de diferenciación. Este resultado no fue obtenido de líneas celulares separadas, sino que se calculó sobre la base de una suspensión celular en la cual había una mezcla de todas estas poblaciones celulares. Lo que indica que al porcentaje general de cada marcador esté contribuyendo el aporte individual de cada una de las subpoblaciones celulares que porte el marcador correspondiente. Al mismo tiempo, la posibilidad de que no todas las células hayan sido positivas para un marcador, significa que hay células en diferentes estadios de diferenciación, o que este grupo de células corresponde a una subpoblación celular diferente, como las células progenitoras multipotenciales adultas, que pertenecen también a la población de células que forman parte de la médula ósea. Asimismo, que el porcentaje de positividad de un marcador dado, representa a más de un tipo celular, pues se conoce que varias de estas células son portadoras de un mismo marcador de superficie que las identifica (223).

Generalmente, muchas son las moléculas que pueden ser utilizadas para la caracterización de las diferentes poblaciones celulares que constituyen elementos formos de la médula ósea. En la subpoblación de células hematopoyéticas el marcador CD34, así como el CD38 y el CD45, son considerados dentro del inmunofenotipo característico de esta población, ya que constituyen marcadores de linaje celular (224;225). Por otra parte, dentro de la subpoblación de células mesenquimales que forman parte del repertorio de las células de la médula ósea, se ha identificado otro antígeno de superficie válido para su caracterización, el CD90 (226-228). Este antígeno se detectó de manera

satisfactoria en las células que se estudiaron, aportando también como el resto de los antígenos un porcentaje en la identificación de la estirpe celular. Un aspecto que se debe destacar y que conforma el elemento básico de este trabajo, es que los porcentajes de células positivas para los marcadores de superficie celular, se encuentran dentro del rango que se describe en la literatura (217;218;229).

En resumen, podemos afirmar que aproximadamente entre el 17 % y el 20 % de las células de médula ósea utilizadas para el trasplante, se correspondían con células de la estirpe hematopoyética y el 23 % a células estromales, lo que nos permitió caracterizarlas y sugerir la heterogeneidad de esta población en la médula ósea. Por otro lado, se pudo evidenciar que estas células fueron capaces de generar un efecto restaurador, siendo adecuadas para nuestro estudio.

3. Establecimiento de la concentración de CMMO para el trasplante

Estudio morfológico

Desde hace varias décadas el trasplante de células, ha constituido una vía alternativa de tratamiento para las enfermedades degenerativas en el sistema nervioso, donde se conoce que el principal problema de la pérdida de las células que componen dicho sistema, radica en que son células muy diferenciadas que pierden su capacidad para proliferar, y de ahí que a pesar de su plasticidad, este hecho provoque deficiencias funcionales irreversibles (230-232). Así, en la enfermedad de Huntington el cambio patológico que probablemente desempeña el papel principal en la sintomatología de la enfermedad, es la muerte de las neuronas gabaérgicas de talla media del estriado (233). Esta pérdida ocasiona diferentes alteraciones morfofuncionales, que al parecer son las responsables de los síntomas observados en estos pacientes. Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha generado en los últimos años es la terapia celular con células madre, para sustituir a las células dañadas constituyendo una vía potencial para el tratamiento de la enfermedad de Huntington (38). El aislamiento de células embrionarias humanas, la aparente e inesperada potencialidad de las células madre adultas y el desarrollo de la terapia génica nos pueden conducir a tratamientos de enfermedades incurables como la enfermedad de Huntington (234). Las aplicaciones de las células madre, se basan fundamentalmente en su potencial de diferenciación y su capacidad para servir como vehículo terapéutico de genes (234). De ahí la importancia de tener una fuente segura y confiable de células para su uso en el injerto celular si tenemos en cuenta que numerosos trabajos en la literatura demuestran la utilidad de las células madre en la

recuperación del tejido dañado (235;236). En este estudio, se emplea como fuente de trasplante, células procedentes de la médula ósea de rata. El establecimiento de la concentración a la cual se utilizan las células, tuvo el objetivo de maximizar la posibilidad de un efecto positivo sobre las alteraciones conductuales y morfológicas previamente encontradas en el modelo de ácido quinolínico (237). Como referencia se utilizaron los valores de concentración celular de los trasplantes realizados en el modelo de ratas hemiparkinsonianas llevado a cabo por un grupo de investigación del Centro Internacional de Restauración Neurológica de CUBA (238).

En este trabajo, se evaluaron tres concentraciones diferentes, distribuidas en tres grupos (Grupo I: 100 000 células totales, Grupo II: 200 000 células totales, y Grupo III: 300 000 células totales) y se demostró que la menor concentración utilizada, era optima para los trasplantes en el modelo de ácido quinolínico. Esta consideración se basó en el análisis de los resultados obtenidos en cada grupo. Así en las ratas perteneciente al Grupo III, con concentración total de 300 000 células, se observó una supervivencia baja de las células trasplantadas asociada a una respuesta inflamatoria. De igual manera, las ratas pertenecientes al Grupo II con concentración de 200 000 células totales mostraron un comportamiento similar al Grupo III. Aunque la respuesta inflamatoria fue menor en este grupo, también se observó una baja supervivencia de las células trasplantadas. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, que evidencian que en los trasplantes, con una elevada concentración celular, no se logra una buena integración con el tejido hospedero (239). A diferencia de las concentraciones anteriores, para las ratas pertenecientes al Grupo I con concentración de 100 000 células totales, se pudo apreciar una elevada supervivencia celular. Esta concentración favorece la integración y migración de las células, lo que propicia, que ellas puedan actuar de manera beneficiosa en el lugar donde fueron implantadas. Estos resultados permiten afirmar que la concentración celular a utilizar en el trasplante es una variable importante, para lograr una adecuada supervivencia e integración de estas células en el tejido hospedero. Por otro lado, como ya han sugerido otros autores, el ambiente alrededor del sitio del implante interviene sobre las células implantadas y viceversa, o sea que las células trasplantadas ejercen una influencia notoria sobre el tejido hospedero, siempre y cuando estas lleguen al sitio del implante en un número adecuado que favorezca su inserción (240). Concerniente a la respuesta inflamatoria que se observó en cada uno de los grupos experimentales, la menos relevante fue encontrada en el Grupo I. Este resultado es congruente con la máxima migración y supervivencia celular observada en el grupo de menor concentración celular. La concentración celular, junto a otros factores ambientales, favoreció que las

células sobrevivieran y se integraran mejor al tejido hospedero. A nuestro juicio, esto explica por qué la respuesta inflamatoria fue menor para este grupo y abundante en los Grupos II y III, donde el factor concentración celular, en consonancia con el daño tisular previo provocado por la lesión con ácido quinolínico, marcó el inicio de la respuesta inflamatoria.

4. Estudio de la supervivencia de CMMO

El estudio de las CMMO marcadas con bisbenzimidida en el estriado lesionado reveló la presencia de células en el sitio del trasplante hasta un año después de haberlo realizado, constituyendo el reporte de supervivencia más prolongado de estas células descrito en la literatura en el modelo experimental de ácido quinolínico lo cual confiere novedad a nuestro estudio. El hecho de que las células trasplantadas en el estriado lesionado hayan sobrevivido en el tejido hospedero, sugiere que ellas pudieran ser las responsables de los efectos positivos encontrados en los estudios conductuales. Otros resultados de nuestro laboratorio han mostrado la capacidad de las CMMO de sobrevivir después del trasplante en el estriado lesionado (241). En contraposición, hay autores que plantean que la supervivencia de las células disminuye con el tiempo y que estas sufren una degeneración similar a la que ocurre en las neuronas del paciente con enfermedad de Huntington (242). Sin embargo, otros autores han reportado una supervivencia prolongada para los trasplantes de otras fuentes celulares, incluso superior a los 6 años (243). En este sentido, los mecanismos por medio de los cuales las células trasplantadas sobreviven permanecen desconocidos, aunque pueden involucrar otros factores, tal como la edad del donante de las células, lo que les confiere ciertas propiedades para su supervivencia (177). Se señala que una concentración excesiva favorece la aglomeración celular, aumentando la competencia por los nutrientes y el desarrollo de una respuesta inflamatoria destructiva contra el tejido implantado, lo cual promueve la muerte celular, como lo muestran los resultados expuestos en el acápite: “Establecimiento de la concentración celular para el trasplante”. En este estudio se logró ajustar a las condiciones de trabajo la menor concentración celular examinada para el trasplante. Esta concentración se considerada apropiada ya que permitió la integración de las células al tejido hospedero con una supervivencia prolongada.

II. Pruebas conductuales

Para evaluar los resultados del trasplante de CMMO se realizaron pruebas conductuales, que permitieron definir el déficit motor y las alteraciones cognitivas que aparecen en los sujetos experimentales y la recuperación o no de estos trastornos después del trasplante de estas células.

Actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

En los estudios dirigidos al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, así como para la búsqueda de alteraciones que expliquen su fisiopatología, se muestra el uso de diferentes modelos experimentales que tratan de simular sus características clínicas. En el modelo utilizado en este trabajo, la inyección intraestriatal de ácido quinolínico provocó la muerte de neuronas en el área lesionada, que indujo alteraciones motoras (125;244). En este estudio, se evaluó la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina, como predictiva del grado de déficit motor presente en las ratas, tanto antes de realizar el trasplante de CMMO como después de este. Esta conducta motora es dosis dependiente y usualmente se acompaña de episodios de "rotaciones en barril" (125;245), lo que se atribuye a una asimetría de la actividad de la dopamina entre el estriado lesionado y el sano (246). El grupo sano mostró una conducta estereotipada típica, reacción hipercinética característica de un cerebro intacto ante la acción de un agonista dopaminérgico. En esta prueba se evidenció que las ratas lesionadas desarrollaron una actividad rotatoria ipsilateral al hemisferio lesionado. Esta asimetría se asocia a la pérdida de las proyecciones gabaérgicas ya descrita por otros autores (125).

Un mes después del trasplante de CMMO la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina disminuyó significativamente, lo que habla a favor de la efectividad del trasplante de CMMO sobre la recuperación de células en el área lesionada. Estos resultados están en línea con los de otros autores que aseveran que el trasplante de CMMO, mejora los trastornos conductuales en las ratas lesionadas con ácido quinolínico (125;247).

Prueba de las habilidades motoras de las extremidades anteriores

Esta prueba llamada también "Prueba de la Escalera" es un ensayo eficaz para evaluar el uso de las extremidades anteriores en los roedores, y se ha considerado una prueba compleja de conducta sensorimotora (248) que depende de la integridad del circuito intrínseco cortico-estriato-palidal (200). Durante el experimento, observamos que la lesión unilateral del estriado con ácido quinolínico provocó una mayor dificultad en la utilización de ambas extremidades anteriores en los grupos lesionados, cuando se compararon con el grupo control sano. Opinamos que, cuando aplicamos este paradigma a las ratas lesionadas, el deterioro encontrado refleja el daño que ocasionó la pérdida neuronal provocada por la lesión de ácido quinolínico en el estriado. El hecho de que las alteraciones se localicen en ambos miembros superiores, sin predilección por uno de ellos, es consecuencia del daño de circuitos motores de integración, localizados en ambos hemisferios cerebrales implicados en la ejecución de los movimientos de ambos miembros; de ahí la importancia de conocer la integridad de las vías nerviosas que intervienen en la corrección postural de las ratas (249). También se demostró que después del trasplante de CMMO, los sujetos experimentales mejoraron en el uso de las extremidades anteriores, por lo que con esta prueba se evidenció también el efecto positivo del trasplante de CMMO sobre la funcionalidad del área lesionada. En general, nuestros resultados están en correspondencia con lo reportado por otros autores que afirman la recuperación del déficit motor producido por la lesión y la recuperación de este posterior al trasplante de células madre (250;251).

Prueba de la Barra Transversal

Otros aspectos de la función motora también se ven afectados por la lesión inducida por ácido quinolínico (252;253), lo cual es reportado por autores que plantean modificaciones en la marcha y el equilibrio de las ratas lesionadas. En todos los grupos, incluido el grupo de trasplante con CMMO, la distancia recorrida por los sujetos experimentales en la barra se modificó a medida que aumentó la complejidad de la misma (disminución del grosor y cambio de la forma de la barra). Estos resultados son consistentes con los publicados por otros autores (254;255).

En nuestro estudio, las ratas lesionadas y trasplantadas con vehículo (DMEM) mostraron un déficit de la coordinación motora que se expresa en menores distancias recorridas en la barra y por tanto una disminución en la exploración del eje horizontal. De manera general estos dos grupos presentaron ciertas

disfunciones en el agarre y en el mantenimiento del equilibrio en la barra, lo cual contribuye a las menores distancias recorridas. A partir de los hallazgos descritos anteriormente, podemos hipotetizar que los mecanismos básicos relacionados con esta conducta subyacen en la pérdida del sustrato morfológico que mantenía las conexiones adecuadas en el circuito motor antes de la lesión. En el grupo trasplantado con CMMO esta conducta se vio atenuada, observándose una mejor coordinación de las extremidades durante la prueba. Nuestros resultados apuntan a que el éxito de las ratas trasplantadas con CMMO es producto del efecto restaurativo que se le ha atribuido a estas células y que repercute positivamente sobre la función motora (256;257).

Las exploraciones motoras realizadas permitieron comprobar que la lesión estriatal unilateral con ácido quinolínico afecta profundamente varios aspectos de la función motora, de forma semejante a lo que ocurre en pacientes con Enfermedad de Huntington y que el trasplante de CMMO atenúa de forma significativa estos déficits motores.

Prueba de Reconocimiento de Objetos

A los ganglios basales se les ha atribuido funciones de memoria (258) en particular aquellas relacionadas con la memoria de procedimiento o habilidades motoras. También se describen en la literatura otras afectaciones de la memoria visual, evidenciada por alteraciones en la prueba de reconocimiento de objetos en ratas con lesión estriatal (259). Nuestros resultados muestran que durante el primer día de ejecución de la prueba todos los sujetos de los diferentes grupos experimentales exploran de manera similar los dos objetos idénticos. Sin embargo, las ratas lesionadas emplean menos tiempo en la exploración que el resto de los grupos, lo que concuerda con el grupo de Bengoetxea y colaboradores que plantean que la lesión estriatal reduce la conducta exploratoria (260). Los resultados de nuestro estudio confirman que durante el segundo día de la prueba, las ratas trasplantadas exploran significativamente más y muestran una mayor preferencia en la exploración del nuevo objeto que las ratas lesionadas con ácido quinolínico y las trasplantadas con vehículo DMEM, sugiriendo una recuperación de la memoria y del reconocimiento visual, lo cual está en línea con lo reportado por otros autores (202;260-262). No obstante, la mejoría que experimentó el grupo de trasplante con vehículo DMEM plantea la pregunta de si este efecto es el resultado de la presencia de las células trasplantadas o un efecto inespecífico de la inyección. Teniendo en cuenta que como DMEM contiene altos niveles de aminoácidos, vitaminas y glucosa, no sería sorprendente que algún beneficio se reporte después de la

aplicación local del mismo en el tejido lesionado. Por ejemplo, y en correspondencia con este resultado, en la literatura se reportan efectos beneficiosos con la inyección de DMEM sobre el mantenimiento y diferenciación de células epiteliales (263). De este resultado se concluye que para nuevos estudios se seleccionen al mismo tiempo otros controles para el trasplante de las células.

Laberinto Acuático de Morris

Esta prueba mide el aprendizaje y memoria espacial en ratas, capacidad que se basa en el uso y conservación de la información visual que tiene lugar durante la adquisición y la retención. Este ensayo es altamente dependiente de la información procesada y almacenada en múltiples regiones cerebrales, particularmente en la formación hipocampal (264). Se conoce que la memoria espacial está ligada a la función del hipocampo (265) lo que se confirma en nuestro resultado al comprobar que la lesión unilateral en el estriado inducido por ácido quinolínico no afectó la prueba de adquisición.

Sin embargo, los resultados obtenidos aportaron evidencias sobre un efecto benéfico del trasplante en la prueba de retención efectuada al final del entrenamiento. La medida utilizada para ello, fue el número de veces que la rata pasó por el lugar donde se encontraba la plataforma de escape. El mejor desempeño encontrado en el grupo trasplantado, concuerda con las evidencias que en este sentido otros autores han señalado sobre los cambios cognitivos que pueden experimentar los sujetos tras el trasplante de células madre (266;267).

Consideración general relativa a las pruebas conductuales

Los mecanismos que median la mejoría en la ejecución de los diferentes paradigmas conductuales en el grupo trasplantado pudieran estar relacionados con las propiedades restaurativas que se le atribuyen a las células madre (268;269). Se sabe que estas células implantadas, en condiciones adecuadas, son capaces de diferenciarse en células especializadas capaces de reemplazar el tejido dañado (270;271). Por otro lado, la acción positiva del trasplante sobre la conducta motora y cognitiva está mediada a su vez por los diferentes factores neurotróficos secretados por las CMMO (272) que ejercen su acción sobre células que circundan los tejidos lesionados.

Las neurotrofinas liberadas por las CMMO potencian la supervivencia de las neuronas, favorecen su diferenciación y funcionamiento e inducen la formación de sinapsis (273;274). Han sido publicados

datos referentes a la producción por parte de las CMMO de estos factores tales como el BDNF (275;276). Aunque, se necesita profundizar más en el conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales el trasplante de células actúa sobre la zona lesionada, esta podría ser una diana farmacológica interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, especialmente la enfermedad de Huntington. Esta y otras ideas nos llevaron a realizar en nuestro trabajo los estudios moleculares y morfológicos que discutimos a continuación.

III. Estudios moleculares

La presencia de cambios en la expresión del BDNF ha sido descrita en un número diverso de condiciones patológicas, incluida la enfermedad de Huntington (277;278). Esta proteína es producida por neuronas corticales y es necesaria para la supervivencia de las neuronas estriatales, razón por la cual se utiliza en terapias neuroprotectoras aplicadas en el estriado (279). Nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión del gen a nivel del estriado en los grupos lesionados con ácido quinolínico y el grupo de trasplante con vehículo (DMEM), que sustenta el fallo en la producción de esta proteína secundaria a la lesión, lo que concuerda con lo planteado por otros autores (280;281). Por el contrario, un aumento del porcentaje en la expresión de *bdnf* fue evidente en el estriado y la corteza de los grupos trasplantados, lo cual está en congruencia con lo reportado en la literatura por otros autores (282). Teniendo en cuenta nuestros hallazgos y lo planteado por Jiao y cols cuando opinan sobre el efecto que tiene el BDNF aumentando la supervivencia y diferenciación de neuronas estriatales (283) consideramos que el incremento en la expresión de esta proteína en el grupo de trasplante es el responsable de los efectos positivos encontrados en este grupo desde el punto de vista conductual, así como de los cambios morfológicos que ya han sido presentados. Los mecanismos por medio de los cuales esta neurotrofina ofrece neuroprotección en la actualidad no se conocen con claridad. Se ha planteado que puede involucrar entre otros la regulación de proteínas que inhiben la apoptosis como por ejemplo las caspasa-2 y 9, que juegan un papel crítico en la muerte celular estimulada por la privación de factores tróficos en las neuronas (284).

La cuantificación de BDNF en las mismas estructuras donde ya conocíamos la expresión del gen mostró la capacidad de las células trasplantadas para aumentar los niveles de BDNF en el cuerpo estriado lesionado y la corteza, lo que pudiera ser suficiente para explicar los efectos benéficos de las CMMO, aún sin que se produzca una diferenciación a fenotipos neuronales y el restablecimiento de la

conectividad normal (285). Diversos reportes en la literatura demuestran que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea pueden producir factores neurotróficos y reparar el tejido dañado (286;287). Se conoce que el BDNF induce respuestas nucleares que son fundamentales para la promoción de la supervivencia y la recuperación de la lesión (288), acción que es posible cuando se une al receptor TrkB pre- y post-sináptico, y participa en la modulación de la transmisión sináptica, actuando en forma autocrina o paracrina (289). De acuerdo con nuestros resultados, es posible que las células de la médula ósea trasplantadas constituyan la fuente de BDNF, ya que las concentraciones de la proteína sólo se incrementan en el grupo trasplantado con CMMO.

Considerándolo de ese modo, el trasplante de CMMO puede constituir una alternativa a la infusión directa de BDNF en el cerebro, con la ventaja de que la producción celular de BDNF podría ser regulada fisiológicamente, lo que no es posible en un sistema de infusión artificial. Por otra parte, las CMMO podrían producir factores distintos del BDNF que también pueden contribuir a la recuperación.

El BDNF se transporta anterógrada y retrógradamente (288), lo cual podría explicar el aumento del BDNF cortical después del trasplante de células de médula ósea en el cuerpo estriado ipsilateral. Se conoce que la estructura que está afectada mayoritariamente en la Enfermedad de Huntington, es el estriado (290). Sin embargo, se sabe que otros núcleos y estructuras, como la corteza cerebral, sufren degeneración secundaria a medida que avanza la enfermedad, (291). De ahí, que se estudiara la corteza anterior, por constituir un componente clave en el circuito cerebral que controla la conducta motora en estado normal y de manera particular en la Enfermedad de Huntington.

A partir de los elementos expuestos y nuestros resultados, planteamos que las CMMO trasplantadas en el sitio de la lesión, a través de un aumento de la producción de BDNF, ejercen una influencia beneficiosa en el cuerpo estriado lesionado, atenuando los déficits derivados de los mecanismos neuropatológicos que operan en la enfermedad de Huntington. Estos resultados funcionales apoyan el uso potencial de las CMMO para reparar el tejido cerebral dañado (286).

IV. Estudios morfológicos

ESTUDIO HISTOLÓGICO

En este trabajo se evaluó cómo se manifestó la pérdida neuronal después de la lesión neurotóxica con

ácido quinolínico y cómo después del trasplante de CMMO las células trasplantadas sobreviven en el tejido hospedero.

Las características neuropatológicas que se han descrito para la enfermedad de Huntington causadas por el glutamato y otros aminoácidos excitatorios se definieron desde la década de los 60 del pasado siglo por John Olney y cols. (292). Este estudio confirma, que la lesión que se induce con ácido quinolínico reduce de manera importante la densidad celular, lo que causa de manera secundaria una pérdida de la imagen definida en parches característica del estriado. Trabajos previos han mostrado observaciones histológicas similares que demuestran que el ácido quinolínico inyectado en el estriado es responsable de la neurotoxicidad selectiva de neuronas en esta estructura (213). La lesión que hallamos en el grupo de trasplante con vehículo (DMEM) fue muy similar a la mostrada en el grupo con lesión de ácido quinolínico, mientras que el grupo de trasplante de CMMO exhibe un restablecimiento en la citoarquitectura del estriado. De forma general se describe que el trasplante de células madre actúa positivamente sobre los tejidos dañados (237;293). Nuestros resultados confirman este efecto beneficioso de las CMMO en el restablecimiento del área lesionada.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Para determinar si los cambios moleculares y morfológicos en la red neuroglial pudieran estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Huntington, se analizó la respuesta astrocítica y la expresión de NeuN en el cerebro de las ratas con lesión inducida por ácido quinolínico y trasplantadas con las CMMO.

Hay grupos de trabajo que apoyan el papel de la GFAP como un marcador astrocítico con importantes implicaciones para la función cerebral (294). En este sentido, se ha planteado que la astrocitosis reactiva está fuertemente implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (295). En el estriado de todas las ratas tratadas con ácido quinolínico se demostró una respuesta astrogliar severa, evidenciada a través de la actividad GFAP con aumento de la densidad de astrocitos por mm^2 , que contrasta con la presencia para estos mismos grupos de un Fluor Jade C positivo que indica degeneración neuronal y que sugiere que el aumento en la expresión de GFAP en el tejido, se encuentra asociada a la pérdida celular. Estos resultados están en congruencia con lo señalado por otros autores sobre la respuesta astrogliar en enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Huntington (296).

El NeuN es un marcador específico para neuronas. Todas las células neuronales del sistema nervioso central y periférico incluyendo las interneuronas pequeñas, tales como las células granulares del cerebelo son inmunoreactivas para el NeuN (297). Nuestros resultados mostraron inmunoreactividad positiva para este marcador, en el grupo control sano y el grupo de trasplante con CMMO asociado a un aumento de la densidad neuronal por mm^2 , esta observación es consistente con la idea de que las CMMO trasplantadas adquieren un fenotipo parecido al de las células neuronales. Por otra parte, sustenta lo planteado por otros autores en la literatura, cuando se refieren a la capacidad que tienen las células madre de convertirse en el fenotipo celular específico para reemplazar las del tejido dañado (194). Por el contrario, la observación de que este marcador fue negativo en las poblaciones celulares de los grupos de lesión con ácido quinolínico y en el grupo de trasplante con vehículo (DMEM) unido a un Fluor Jade C positivo, demuestra degeneración neuronal. Estos datos hablan a favor de que las CMMO trasplantadas experimentan cierta diferenciación neuronal. Por esta razón, se hizo necesario conocer si estas células expresan además algún marcador específico de neuronas de talla media, que son las células más afectadas en los pacientes portadores con enfermedad de Huntington.

La descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es la enzima responsable de la síntesis de GABA, que en el sistema nervioso central juega un papel importante en la neurotransmisión inhibitoria. Nuestros resultados muestran la ausencia de inmunoreactividad a GAD en el grupo de lesión con ácido quinolínico y en el grupo de trasplante con vehículo DMEM lo que corrobora la pérdida de la población de neuronas gabaérgicas en el estriado, lo que está en línea con lo reportado por otros autores (298). Por el contrario, encontramos reactividad positiva para la GAD en el grupo control sano y el grupo de trasplante con CMMO, lo cual pudiera sugerir para este último grupo una recuperación, que a nuestro juicio es brindada por la producción de neurotrofinas por parte de las células trasplantadas. Se conoce que el BDNF es necesario para la regulación de la actividad de la GAD (299) potenciando la liberación de GABA, lo cual puede resultar importante en la regulación de la plasticidad sináptica (300).

VI. Consideraciones finales

La enfermedad de Huntington es una enfermedad hereditaria autosómica dominante que clínicamente se caracteriza por alteraciones motoras, síntomas psiquiátricos y deterioro cognitivo (301). Actualmente, no existe ningún tratamiento que permita curar o enlentecer el progreso de la enfermedad. La búsqueda de alternativas terapéuticas incluye el uso de células madre para la reparación de los tejidos dañados (302).

Los principales resultados de esta tesis permiten proponer el modelo que se presenta en la Figura 24, para dar una explicación plausible a los mecanismos que se ponen en marcha antes, durante y después del trasplante de CMMO en el modelo experimental de enfermedad de Huntington por lesión con ácido quinolínico en el estriado. La Figura 24A muestra el estriado de la rata en condiciones fisiológicas, donde se modela la integridad de la estructura.

En este modelo experimental se evidenció la aparición de cambios conductuales, morfológicos y moleculares que remedan los que ya se han descrito para esta enfermedad (Fig. 24B). Después del daño cerebral inducido por ácido quinolínico estos cambios se demostraron por la pérdida neuronal asociada a una astrogliosis reactiva que provoca la ruptura de la integridad del circuito motor. Esto condujo a alteraciones en la conducta motora y cognoscitiva de los sujetos experimentales. Se pudo comprobar la disminución en la expresión y cuantificación del BDNF y la disminución en la actividad de la GAD. Por otro lado, el tratamiento con CMMO (Fig. 24C), tuvo una influencia positiva atenuando los déficits motores y cognoscitivos provocados por la lesión.

Se concluye que los mecanismos por medio de los cuales las células trasplantadas en el estriado lesionado producen la recuperación motora y cognoscitiva de las ratas, son multifactoriales:

Primero, la observación de un aumento en la densidad neuronal y que las células trasplantadas expresan la proteína NeuN, sugiere la transformación de ellas en un fenotipo neural gabaérgico, lo cual indica un efecto neurorestaurador de estas células que pudiera ser eficaz actuando a nivel intraestriatal. Sin embargo, aún es imposible saber si estas células son capaces de restablecer contactos sinápticos localmente y fuera del estriado, como normalmente hacen las células espinosas de talla media del estriado. Investigaciones futuras podrán abordar este crucial aspecto.

Segundo: Es posible que la llegada de BDNF desde otras áreas al tejido lesionado, contribuya al efecto positivo observado tras el trasplante. Se conoce que la lesión a nivel del estriado puede estimular la neurogénesis en la zona subventricular y con ello la producción de factores tróficos, incluido el BDNF (303). Sin embargo no se excluye la posibilidad de que la liberación de BDNF que se detecta en este estudio y que entre otras acciones produce un aumento de la GAD, provenga de las propias células que fueron injertadas y que unido al microambiente del trasplante ofrezca el escenario adecuado para producir un efecto positivo en el área lesionada a través de la activación de otros factores como por

ejemplo interleucinas, y/o factores de crecimiento. Estos agentes garantizan la supervivencia de las células nerviosas, y elevan el umbral de resistencia al ácido quinolínico. Por otro lado se describen para estas células que forman parte del sistema inmunológico, efectos de autoinmunidad protectora como una respuesta fisiológica que se produce después del daño (304) y que depende directamente del microambiente donde fueron implantadas.

Independientemente de los mecanismos involucrados, el tratamiento con CMMO pudiera disminuir el desbalance que existe en el circuito motor en los pacientes con enfermedad de Huntington, lo que les confiere a estas células un papel promisorio como una alternativa de tratamiento para la enfermedad.

Los resultados que se muestran en esta tesis constituyen el primer ensayo preclínico en nuestro medio que evalúa el efecto neurorestaurador de las CMMO como una opción de tratamiento para la enfermedad de Huntington. La posibilidad de utilizar este tipo de células en estos pacientes tiene como ventaja que proceden de la médula ósea, la que constituye una fuente de acceso fácil y brinda una alternativa a la utilización de células de origen neural. Esta investigación muestra el estudio más prolongado de la supervivencia de las CMMO trasplantadas descrito en la literatura unido a resultados positivos en la evaluación de pruebas conductuales y morfológicas que se implementan por primera vez en el modelo de la enfermedad de Huntington.

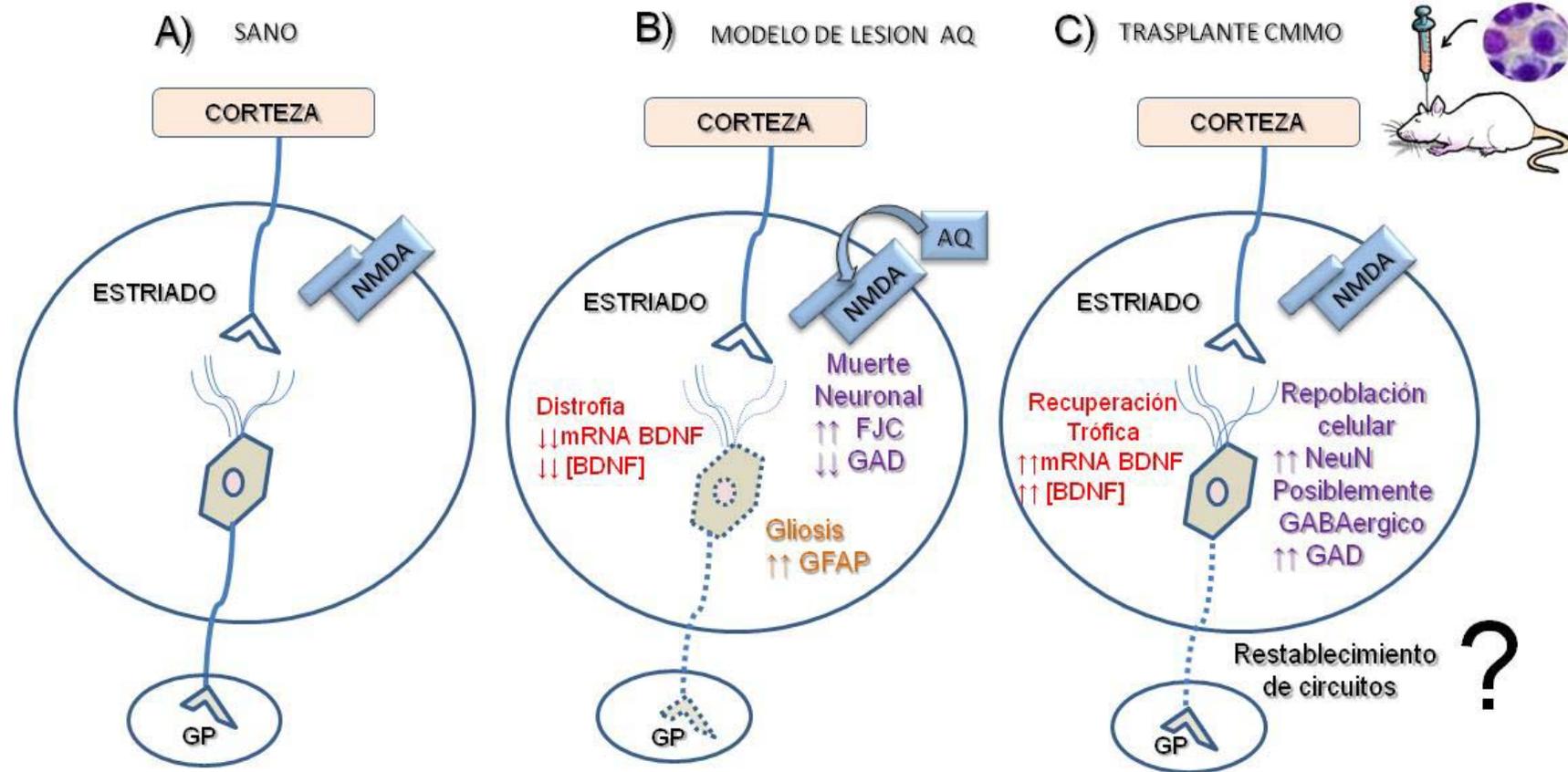


Figura 24. Esquema que resume los principales resultados del trabajo de Investigación. A) Estado Sano. B) Modelo de lesión por inyección de ácido quinolinico (AQ) en el estriado. C) Efecto del trasplante de células mononucleares de médula ósea (CMMO) sobre la esfera cognitiva y la conducta en los sujetos experimentales. NMDA (N-metil D-aspartato); Gp (Globo Pálido); BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor); GFAP (Glial Fibrilar Acid Protein); GAD (descarboxilasa del ácido glutámico); Fluorojade-C (FJC); NeuN (proteína Neuronal Nuclear); GABA (Ácido Gamma Amino Butírico).

CONCLUSIONES

1. El modelo experimental por lesión de ácido quinolínico en ratas produce un daño estriatal que remedia los trastornos cognitivos y motores característicos de la enfermedad de Huntington. En este biomodelo, el resultado satisfactorio de la evaluación del trasplante de CMMO constituye una prueba de concepto necesaria para sustentar su posterior uso en la clínica.
2. El trasplante de CMMO en el estriado lesionado tuvo un efecto terapéutico beneficioso ya que produce cambios tanto en la expresión génica como en las concentraciones de BDNF, que tiene un efecto positivo sobre la recuperación cognitiva y motora de los sujetos experimentales. Estos cambios se asocian con la activación de mecanismos de supervivencia celular los cuales son responsables del efecto neurorestaurador que se le atribuye a las CMMO.
3. El aumento de la densidad neuronal y la expresión de NeuN y GAD, en el estriado lesionado y trasplantado, indica que las células trasplantadas experimentan una polarización hacia un fenotipo neuronal gabaérgico, lo que tiene un valor adicional en la utilidad del trasplante de CMMO en el biomodelo de enfermedad de Huntington.

RECOMENDACIONES

1. Validar el modelo experimental por lesión de ácido quinolínico en ratas y los métodos de estudios morfológicos desarrollados en esta tesis en la evaluación de otra fuente de células madre como grupo control al trasplante de CMMO, con diferente mecanismo de acción.
2. Evaluar las CMMO como terapéutica en otros modelos de la enfermedad de Huntington.
3. Realizar estudios electrofisiológicos para confirmar el papel de las CMMO en la reconexión de los circuitos dañados en el modelo de lesión con ácido quinolínico.
4. Realizar el análisis de la expresión de otras proteínas marcadoras de neuronas espinosas de talla mediana como por ejemplo la fosfoproteína neuronal regulada por dopamina (DARPP32, de sus siglas en inglés dopamine- regulated neuronal phosphoprotein).

AUTOBIBLIOGRAFÍA

ARTÍCULOS DONDE SE HAN DIVULGADO LOS RESULTADOS DE LA TESIS

1. Serrano T, Alberti E, Lorigados L, Díaz-Armesto I, Blanco L, Vallejo A. Caracterización inmunofenotípica de las células de la médula ósea de ratas. Rev Biotecnol Aplic. 2005; 22: 234-6.
2. Serrano T, Blanco Lezcano L, Alberti Amador E, Díaz Armesto I, et al. Establecimiento de las condiciones para el trasplante de células de médula ósea en un modelo de enfermedad de Huntington y su efecto funcional a través de la conducta motora. Rev Colomb Biotecnol. 2011; 2: 107-26.
3. Serrano T, Alberti Amador E, Lorigados Pedre L, Blanco Lezcano L, et al. BDNF in quinolinic acid lesioned rats after bone marrow cells transplant. Neurosci Lett. 2014; 559: 147–51.
4. Serrano T, Pierozan P, Alberti E, Blanco L, De la Cuétara K, González ME, et al. Transplantation of mononuclear cells from bone marrow in a rat model of Huntington's disease. J Neurorestoratol. 2016; 4:95-105.

ARTÍCULOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE LA TESIS

1. Serrano T, Díaz I. Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (BDNF). Aspectos de actualidad. Rev Neurol. 1998; 26: 1027-32.
2. Serrano T, Díaz Armesto I. Terapia con Neurotrofinas. Algunas consideraciones Bioéticas. Rev Neurol. 2002; 35: 794-97.
3. Alberti-Amador E, García-Miniet R, Serrano T, Blanco-Lezcano L, Martínez-Martí L, Mendoza-Mari Y, et al. Evaluación de la supervivencia de las células mononucleadas de la médula ósea trasplantadas en un modelo de ratas con lesión estriatal por ácido quinolinico Rev Neurol. 2005; 40: 518-22.
4. Serrano T, González-Fragela ME, Blanco-Lezcano L, Alberti-Amador E, Díaz-Armesto I, Bauza Y. et al. Rotational and neurochemical activity (in cerebral tissue) of lesioned rats with quinolinic acid and transplanted with bone marrow cells. Brains on-line, 2006; 382-84.
5. Serrano T, Lorigados Pedre L, Bergado Rosado J, Almaguer Melian W, López Rojas J, Alberti-Amador E, et al. Concentraciones del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) en tejido cerebral de ratas sanas. Rev CENIC C Biol. 2009; 40: 135-39.
6. Alberti-Amador E, Los M., García R, Fraga JL, Serrano T, Hernández E, et al. Prolonged survival and expression of neural markers by Bone Marrow-Derived Stem cells transplanted into brain lesion. Med Sci Mon. 2009; 15: 47-54.
7. Blanco Lezcano L, Lorigados Pedre L, Fernández Verdecia CI, Serrano T, Pavón Fuentes N, ET AL. Aplicación del test de la barra transversal modificado para evaluar ratas hemiparkinsonizadas. Acta Biol Colomb. 2010; 15: 191-204.

8. Serrano T, Blanco Lezcano L, García Minet R, Alberti Amador E, Díaz Armesto I, Pavón Fuente N, et al. Enfermedad de Huntington: modelos experimentales y perspectivas terapéuticas. *Acta Biol Colomb* 2011; 16: 21-42.
9. Alberti E, Fraga J, García R, Hernández E, De la Cuétara K, Serrano T. Estudio del polimorfismo genético de las células de la médula ósea y del sistema nervioso central de ratas mediante la técnica de RAPD. *Rev Colomb Biotecnol.* 2011; 13: 42-51.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS NO RELACIONADOS CON EL TEMA DE LA TESIS

1. Serrano T, Lorigados L, Fernández CI. "NGF levels in sera from Alzheimer's disease". *Alzheimer's Res.* 1995; 1: 54-57.
2. Lorigados L., Molina H., Serrano T, Pavón N., Robinson Ma., Alvarez L., "Evolutionary Levels of NGF in Neurodegenerative Disease". *Mol Chem Neuropathol.* 1995; 24: 231-34.
3. Lorigados L., Álvarez L., Pavón N., Serrano T, Blanco L. and Macías R. "NGF in Experimental Model of Parkinson Disease". *Mol.Chem. Neuropathol.* 1996; 1: 225-28.
4. Serrano T, L. Lorigados, S. Almenteros. "Nerve Growth Factor in Normal Human Sera". *NeuroReport.* 1996; 8: 179-81.
5. Armenteros S., Alvarez A. M., Abreu J., González J., Peña L., Serrano T. Adelgazamiento, fiebre y soplo cardíaco en mujer de 58 años. Presentación de un caso. *Rev. Cub. Cardiol. Cir. Cardiovasc.* 1997; 11: 101-4.
6. Robinson M. A., Veliz Y., Bergado J., Serrano T, Rosillo JC., Ivette C., "Toxicidad neuronal de la interleucina 2 recombinante humana en ratas. Validación morfoconductual. *Rev. Neurol.* 1997; 25: 452-56.
7. Dorta AJ., Robinson MA., Mena R., Cepero A., McRae A., Serrano T. Local Synthesis of IgG Subclasses in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's dis Rev.* 1998; 3: 56-61.
8. Robinson MA, Dorta A, Serrano T, McRae A. T Activation Markers from Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's disease Patients. *Alzheimer's dis Rev.* 1998; 3: 21-27.
9. Lorigados L., Pavón N., Serrano T, Robinson MA. Factor de Crecimiento Nervioso y Enfermedades Neurológicas. *Rev Neurol* 1998; 26: 744-48.
10. Lorigados L., Serrano T, Fernández CI, Pavón N., Bergado J., de la Cuétara K., et al. NGF levels in experimental Models of Aging. *Alzheimer's dis Rev.* 1998; 3: 16-18.
11. Dorta A., Barshatzky M, García EN, Serrano T. Niveles de transtirretina en suero y líquido cefalorraquídeo apoyan la hipótesis nutrio-vírica de la Neuropatía epidémica cubana. *Rev Neurol.* 2000; 31: 801-4.
12. Serrano T, Robinson MA, Lorigados L., González ME, Díaz I., Dorta A. Factor de Crecimiento Nervioso Endógeno en pacientes con Enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 2001; 32: 825-28.
13. Serrano T, Díaz Armesto I. Participación de la IL-1 e IL-6 en la etiopatogenia de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 2001; 33: 648-52.

14. Lorigados L, Pavón N, Serrano T, Robinson M. A., Fernandez C. I. Cambios en los niveles de NGF con el envejecimiento y el tratamiento neurotrófico en PNH. *Rev Neurol.* 2001; 33: 417-21.
15. Robinson MA., Gracia M., de Luigi A., Serrano T, Llibre JJ., Hernández E. Citocinas circulantes en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 2001; 33: 99-100.
16. Lorigados Pedre L, Pavón N., Alvarez L, McRae A, Serrano T, et al. Nerve Groth Factor Levels in Parkinson Disease and experimental Parquinsonian rat. *Brain Research.* 2002; 952: 122-27.
17. Blanco L Lezcano, Pavón N., Serrano T. Blanco-Lezcano V., Coro Grave-de Peralta Y, et al. Núcleo Pedúnculo Pontino. Una estructura involucrada en el procesamiento motor y emocional. *Rev Neurol.* 2003; 38: 1181-85.
18. Blanco Lezcano L, Rocha L, Martínez L, Álvarez González L, Pavón N., Serrano T, and et al. La lesión de la sustancia negra pars compacta y del núcleo subtalámico modifica la densidad de receptores muscarínicos en distintos núcleos de los ganglios basales. *Rev Neurol.* 2004; 38: 128-32.
19. González ME, Robinson MA, Serrano T. Llibre J J. Indicadores de estrés oxidativo e inmunológicos en pacientes con enfermedad de Alzheimer. *Arch Neuroci.* 2004; 9: 3-10.
20. Lorigados L., Morales L., Pavón N., Serrano T, Robinson MA, García Navarro ME, and et al. Alteraciones inmunológicas en pacientes epilépticos asociados a la localización del foco epileptogénico. *Rev Neurol.* 2004; 39:101-4.
21. Lorigados L, Morales L, Pavón N, Serrano T, Robinson MA, García ME and et al. *Rev Neurol.* 2005; 40: 319-20.
22. Lorigados L, Morales L, Pavón N, Serrano T, Robinson MA, García ME, and et al. *Rev Neurol.* 2005; 41: 411-12.
23. Christian L, Rabassa J, Abreu L, Berty J, Robinson MA, Robinson JE, Serrano T, and et al. Utilidad de la ecografía tímica en la Miastenia Gravis. *Med Reabil.* 2006; 25: 19-21.
24. Blanco Lezcano L., Lorigados L., Martínez L., Pavón N., Serrano T, and et al. Alterations in the density of gabaergic BDZ, mu opioid and muscarinic receptors of the pedunclepontine nucleus in a 6-hydroxidopamine hemiparkinsonian rat model. *J Biol Res.-Thessaloniki.* 2008; 9:35-43.
25. Blanco L., lorigados L., García R., Martínez L., Pavón N., González ME., Serrano T, and et al. Efecto neuroprotector de la administración sistémica de (-) nicotina en ratas hemiparkinsonizadas. *Biotechnol Aplic* 2008; 25: 117-125.
26. Serrano T, Díaz Armesto I., Felipe Montero J. Influencia de las citocinas (Il-1 e Il-6) en la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer. En *Neuroinmunología Clínica.* La Habana: Academia; 2009.p. 194-203.
27. Lorigados Pedre L., Pavón Fuentes N., Serrano T, Robinson Agramante M. and Lilia María Morales Chacón. En *Neuroinmunología clínica.* La Habana: Academia; 2009. p. 204-12.

28. Blanco Lezcano L., Lorigados L., Martínez L., Pavón N., González ME., Serrano T., and et al. Efecto neuro protector de la administración sistémica de MK-801 en el núcleo pedúnculo pontino de ratas hemiparkinsonizadas. *Rev Biotecnol Aplic.* 2009; 26: 53-58.
29. Blanco L., Lorigados L., Martínez L., García R., Pavón N. González ME., Serrano T., and et al. Neurochemical changes in the pedunculopontine nucleus of hemiparkinsonian rats and effect of different treatment. *Rev Biotecnol Aplic.* 2009; 26: 66-68.
30. Lorigados L., Pavón N., Serrano T., Blanco L., Almaguer W., Fernandez I., and et al. Modelos experimentales de Neurodegeneración: Tratamiento restaurativo y factor de crecimiento nervioso. *Rev Mex Neurosci* 2010; 10: 264-73.
31. Blanco L., Lorigados Pedre L., González Fragueta ME., Serrano T., Pavón Fuentes N., and et al. Efecto de la administración intracerebral de mk-801 y (-) nicotina en las concentraciones extracelulares de glu y gaba en el núcleo pedunculopontino de ratas. *Acta biol Colomb.* 2011; 16: 61-76.
32. Blanco Lezcano L., Lorigados Pedré L. Serrano T., Pavón Fuentes N., González ME. Liliana Francis Turner. El núcleo pedunculopontino y su relación con la fisiopatología de enfermedad de parkinson. *Acta Biol. Colomb.* 2012; 17: 445-62.
33. Mercerón-Martínez D., Almaguer-Melian W., Serrano T., Lorigados L, Pavón N. and Bergado JA. Hippocampal neurotrophins after stimulation of the basolateral amygdala, and memory improvement in lesioned rats. *Restor Neurol Neurosci.* 2013; 31: 189–97.
34. Lorigados Pedre L., Morales Chacón L., Orozco Suárez S, Pavón Fuentes N., Estupiñán Díaz B, Serrano T., and et al. Inflammatory Mediators in Epilepsy *Curr Pharm Des.* 2013; 19: 6766-72.
35. Lorigados L., Pavón N., Serrano T., Robinson M., Morales L., Rocha L., and et al. Inmunología e Inflamación. *Investigaciones Básicas. Libro: Lineamientos para el tratamiento de las Epilepsias farmacorresistentes en Cuba.* 2014; Capítulo 12. p 130-40.
36. Jimenez-Martín J., Blanco-Lezcano L., González-Fragueta M.E. Díaz-Hung M.-L, Serrano T J.L. Almenares and et al. Effect of neurotoxic lesion of pedunculopontine nucleus in nigral and striatal redox balance and motor performance in rats. *Neuroscience.* 2015; 289: 300–14.
37. Lisette Blanco-Lezcano, Javier Jimenez-Martin, Mei-Li Diaz-Hung, Esteban Alberti-Amador, Maylin Wong-Guerra, Ma. Elena Gonzalez-Fragueta, Barbara Estupinan-Diaz, Teresa Serrano-Sanchez, Liliana Francis-Turner, Susana Delgado-Ocana, Yanier Nunez-Figueroa, Yamile Vega-Hurtado and Isabel Fernandez-Jimenez. Motor dysfunction and alterations in glutathione concentration, cholinesterase activity, and bdnf expression in substantia nigra pars compacta in rats with pedunculopontine lesion. *Neuroscience* 348 (2017) 83–97.

EVENTOS CIENTÍFICOS DONDE SE HAN PRESENTADO LOS RESULTADOS DE LA TESIS.

1. **Teresa Serrano**, Lourdes Lorigados-Pedre, Jorge Bergado-Rosado, William Almaguer-Melian, Esteban Alberti-Amador, Ivan Díaz-Armesto. Cuantificación del factor de crecimiento derivado del cerebro (FCDC) en rata. 7^{mo} Congreso de Inmunología. Mayo, 2011.
2. **Teresa Serrano**, Lourdes Lorigados-Pedre, Jorge Bergado-Rosado, William Almaguer-Melian, Esteban Alberti-Amador, Ivan Díaz-Armesto. Normal Concentration of BDNF in rats cerebral tissue. Immunopharmacology 2011. 2nd Internacional Congreso on Immunopharmacology, Junio, 2011.
3. **Teresa Serrano** Importancia de las células madre en la terapia celular. Jornada Interna del CIREN, Febrero 2012.
4. Daymara Mercerón, William Almaguer, **Teresa Serrano**, Lourdes Lorigados, Jorge A Bergado. Jornada Interna del CIREN. Papel del BDNF y NGF en la modulación de la Neuroplasticidad por estimulación de la amígdala. Febrero 2012
5. **Teresa Serrano**. X Congreso de la asociación latinoamericana de Inmunología, 29 Mayo-2 de Junio, INMUNOPERÜ2012, Lima. Perú. 2012.
6. Daymara Mercerón Martínez, William Almaguer Melian, **Teresa Serrano**, Lourdes Lorigados Pedre, Jorge A. Bergado Rosado. Papel del BDNF y el NGF en la modulación de la neuroplasticidad por estimulación de la amígdala. NEUROCUBA 2013, 24-26 Abril, 2013.
7. **Teresa Serrano**, Alberti-Amador E, Bergado Rosado, Pavón-Fuentes N, Lorigados-Pedre L, Robinson-Agramonte, Díaz –Armesto I. Factor de Crecimiento Derivado Del cerebro (FCDC), en el modelo de ácido quinolínico con trasplante de células de médula ósea. Hematología 2013. Palacio de Convenciones de la Habana, Cuba 20-24 Mayo de 2013.
8. **Teresa Serrano**, Esteban Alberti, Nancy Pavón, Lourdes L, Iván Díaz Armesto, MA Robinson, Jorge Bergado. Neuroprotección en un modelo de ácido quinolínico con trasplante de células de médula ósea. LATINFARMA 2013. Palacio de Convenciones, 21-25 de Octubre 2013.
9. **Teresa Serrano**, Esteban Alberti, Lisette Blanco, Lourdes Lorigados, Jorge Bergado. 4^{ta} Conferencia científica Internacional Restauración Neurológica 2014. Tema Libre. Actividad conductual y parámetros moleculares en el modelo de enfermedad de Huntington inducido por ácido quinolínico Palacio de Convenciones, la Habana, Cuba, 5-7/Marzo2014.
10. **Teresa Serrano**, Esteban Alberti, Lisette Blanco Lezcano, Lourdes Lorigados, Iván Díaz, Karelys de la Cuétara, Jorge Bergado. Influencia del trasplante de células de médula ósea sobre la actividad conductual en el modelo de enfermedad de Huntington inducido por ácido quinolínico. Forum de Ciencia y Técnica. Evaluación: RELEVANTE. CIREN. Junio/2014.
11. **Teresa Serrano**. Presentación en el Premio Anual de Salud a nivel central. Modalidad de Publicación: BDNF in quinolinic acid lesioned rats after bone marrow cells transplant Neuroscience Letters, Volume 559, 24 January 2014, Pages 147–151. CNCS 20 de Junio 2014. Evaluación: RELEVANTE

12. **Teresa Serrano**. Presentación en el Forum Municipal de Ciencia y Técnica 2014. Influencia del trasplante de células de médula ósea sobre la actividad conductual y parámetros moleculares en el modelo de enfermedad de Huntington inducido por ácido quinolínico. 23 de Septiembre /2014. Evaluación: RELEVANTE.
13. **Teresa Serrano** Presentación en el Premio Anual de Salud a nivel Nacional. Modalidad de Publicación: BDNF in quinolinic acid lesioned rats after bone marrow cells transplant Neuroscience Letters, Volume 559, 24 January 2014, Pages 147–151.CNCS 26 de Nov 2014. Evaluación: PREMIO.
14. **Teresa Serrano**, P. Pierozan, E.Alberti, L. Blanco, K. De la Cuétara, M. E. González, N. Pavón, L. Lorigados, M. A. Robinson, J. A. Bergado. Transplant of mononuclear cells from bone marrow in a rat model of Huntington’s disease. VII FORUM DE CIENCIA Y TÉCNICA. CIREN. 5-8 Julio 2016 RELEVANTE.
15. **Teresa Serrano**, Esteban Alberti, Lisette Blanco, Karelys De la Cuétara, María Elena González, Nancy Pavón, Lourdes Lorigados, María de los Angeles Robinson, Jorge Alberto Bergado. Supervivencia de células mononucleares de médula ósea en un modelo de lesión con ácido quinolínico en rata: efectos sobre el procesamiento sensorimotor. XIII Jornada Científica, XXVIII Aniversario del CIREN. 23-25 Febrero 2017.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Dayalu P, Albin RL. Huntington disease: pathogenesis and treatment. *Neurol Clin* 2015;33(1):101-14.
- (2) Huntington G. On chorea. *Med Surg Rep* 1872;26:317-21.
- (3) Gregory S, Scahill RI, Seunarine KK, Stopford C, Zhang H, Zhang J, et al. Neuropsychiatry and White Matter Microstructure in Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 2015;4(3):239-49.
- (4) Vinther-Jensen T, Larsen IU, Hjermand LE, Budtz-Jorgensen E, Nielsen TT, Norremolle A, et al. A clinical classification acknowledging neuropsychiatric and cognitive impairment in Huntington's disease. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:114-118.
- (5) Van Duijn E, Reedeker N, Giltay EJ, Eindhoven D, Roos RA, van der Mast RC. Course of irritability, depression and apathy in Huntington's disease in relation to motor symptoms during a two-year follow-up period. *Neurodegener Dis* 2014;13(1):9-16.
- (6) Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeats that is expanded and unstable on Huntington's Disease chromosomes. *Cell* 1993;72:971-83.
- (7) Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, et al. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001;291(5512):2423-8.
- (8) Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH. Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* 2009;324(5932):1327-30.
- (9) Ribeiro FM, Paquet M, Ferreira LT, Cregan T, Swan P, Cregan SP, et al. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2010 6;30(1):316-24.
- (10) Walker FO. Huntington's Disease. *Semin Neurol* 2007;27(2):143-50.
- (11) Palo J, Somer H, Ikonen E, Karila L, Peltonen L. Low prevalence of Huntington's disease in Finland. *Lancet* 1987;2(8562):805-6.
- (12) Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJ, et al. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology* 2016;46(2):144-53.
- (13) Wexler NS, Collett L, Wexler AR, Rawlins MD, Tabrizi SJ, Douglas I, et al. Incidence of adult Huntington's disease in the UK: a UK-based primary care study and a systematic review. *BMJ Open* 2016;6(2): 695-701.
- (14) Leung CM, Chan YW, Chang CM, Yu YL, Chen CN. Huntington's disease in Chinese: a hypothesis of its origin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(8):681-4.
- (15) Paradisi I, Hernandez A, Arias S. Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *J Hum Genet* 2008;53(2):127-35.
- (16) Pridmore SA. The prevalence of Huntington's disease in Tasmania. *Med J Aust* 1990;153(3):133-4.
- (17) Lyon RL. Huntington's chorea in the Moray Firth area. *Br Med J* 1962;1(5288):1301-6.
- (18) Vazquez-Mojena Y, Laguna-Salvia L, Laffita-Mesa JM, Gonzalez-Zaldivar Y, Almaguer-Mederos LE, Rodriguez-Labrada R, et al. Genetic features of Huntington disease in Cuban population: implications for

- phenotype, epidemiology and predictive testing. *J Neurol Sci* 2013;335(1-2):101-4.
- (19) Orth M, Handley OJ, Schwenke C, Dunnett SB, Craufurd D, Ho AK, et al. Observing Huntington's Disease: the European Huntington's Disease Network's REGISTRY. *PLoS Curr* 2011;82(12):1409-12.
 - (20) Beste C, Stock AK, Ness V, Hoffmann R, Saft C. Evidence for divergent effects of neurodegeneration in Huntington's disease on attentional selection and neural plasticity: implications for excitotoxicity. *Brain Struct Funct* 2015;220(3):1437-47.
 - (21) Hariharan A, Shetty S, Shirole T, Jagtap AG. Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology* 2014;45:139-48.
 - (22) Sepers MD, Raymond LA. Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. *Drug Discov Today* 2014;19(7):990-6.
 - (23) Wright DJ, Renoir T, Smith ZM, Frazier AE, Francis PS, Thorburn DR, et al. N-Acetylcysteine improves mitochondrial function and ameliorates behavioral deficits in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *Transl Psychiatry* 2015;5(492):1-10.
 - (24) Adjeroud N, Yague S, Yu-Taeger L, Bozon B, Leblanc-Veyrac P, Riess O, et al. Reduced impact of emotion on choice behavior in presymptomatic BACHD rats, a transgenic rodent model for Huntington Disease. *Neurobiol Learn Mem* 2015;125:249-57.
 - (25) Mazurova Y, Anderova M, Nemeckova I, Bezrouk A. Transgenic rat model of Huntington's disease: a histopathological study and correlations with neurodegenerative process in the brain of HD patients. *Biomed Res Int* 2014;3:1-19.
 - (26) Reilmann R, Lippross V, Holzner E, Gigengack F, Bohlen S, Kugel H, et al. FDG muPET Fails to Detect a Disease-Specific Phenotype in Rats Transgenic for Huntington's Disease - A 15 Months Follow-up Study. *J Huntingtons Dis* 2015;4(1):37-47.
 - (27) Menalled LB, Sison JD, Wu Y, Olivieri M, Li XJ, Li H, et al. Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J Neurosci* 2002;22(18):8266-76.
 - (28) Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 2013;14(10):708-21.
 - (29) Unmack L, I, Vinther-Jensen T, Gade A, Nielsen JE, Vogel A. Assessing impairment of executive function and psychomotor speed in premanifest and manifest Huntington's disease gene-expansion carriers. *J Int Neuropsychol Soc* 2015;21(3):193-202.
 - (30) Mo C, Pang TY, Ransome MI, Hill RA, Renoir T, Hannan AJ. High stress hormone levels accelerate the onset of memory deficits in male Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* 2014;69:248-62.
 - (31) Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 1965;207(5000):953-6.
 - (32) Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124(3):319-35.
 - (33) Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, et al. Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 2006;15(3):407-21.
 - (34) Ozturk TH, Arda B. Ethical and legal aspects of stem cell practices in Turkey: where are we? *J Med Ethics*

- 2008;34(12):833-7.
- (35) Watt H. Ethical aspects of use of fetal/embryonic cells in treatment and research. *Zentralbl Neurochir* 2005 ;66(2):75-8.
 - (36) Golas MM, Sander B. Use of human stem cells in Huntington disease modeling and translational research. *Exp Neurol* 2016;(16):10-21.
 - (37) Amemori T, Jendelova P, Ruzicka J, Urdzikova LM, Sykova E. Alzheimer's Disease: Mechanism and Approach to Cell Therapy. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):26417-51.
 - (38) Deng P, Torrest A, Pollock K, Dahlenburg H, Annett G, Nolte JA, et al. Clinical trial perspective for adult and juvenile Huntington's disease using genetically-engineered mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res* 2016 ;11(5):702-5.
 - (39) Hedges EC, Mehler VJ, Nishimura AL. The Use of Stem Cells to Model Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia: From Basic Research to Regenerative Medicine. *Stem Cells Int* 2016;7:1-9.
 - (40) Mungenast AE, Siegert S, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol Cell Neurosci* 2016;73:13-31.
 - (41) Shen Y, Huang J, Liu L, Xu X, Han C, Zhang G, et al. A Compendium of Preparation and Application of Stem Cells in Parkinson's Disease: Current Status and Future Prospects. *Front Aging Neurosci* 2016;8:117-123.
 - (42) Hernandez P, Dorticos E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología* 2004;20(3):2-17.
 - (43) Dennie D, Louboutin JP, Strayer DS. Migration of bone marrow progenitor cells in the adult brain of rats and rabbits. *World J Stem Cells* 2016;8(4):136-57.
 - (44) Harris L, Zalucki O, Piper M, Heng JI. Insights into the Biology and Therapeutic Applications of Neural Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016;16:1-18.
 - (45) Azedi F, Kazemnejad S, Zarnani AH, Soleimani M, Shojaei A, Arasteh S. Comparative capability of menstrual blood versus bone marrow derived stem cells in neural differentiation. *Mol Biol Rep* 2017 ;44(1):169-82.
 - (46) Long Y, Yang KY. Bone marrow derived cells for brain repair: recent findings and current controversies. *Curr Mol Med* 2003;3(8):719-25.
 - (47) Han S, Wang B, Li X, Xiao Z, Han J, Zhao Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional culture promote neuronal regeneration by neurotrophic protection and immunomodulation. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(7):1759-69.
 - (48) Udalamaththa VL, Jayasinghe CD, Udagama PV. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2016;7(1):110-366.
 - (49) Chen Y, Carter RL, Cho IK, Chan AW. Cell-based therapies for Huntington's disease. *Drug Discov Today* 2014;19(7):980-4.
 - (50) Benraiss A, Goldman SA. Cellular therapy and induced neuronal replacement for Huntington's disease. *Neurotherapeutics* 2011;8(4):577-90.
 - (51) Bordelon YM. Clinical neurogenetics: huntington disease. *Neurol Clin* 2013;31(4):1085-94.

- (52) Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2012;27(9):1083-91.
- (53) Chiodi V, Uchigashima M, Beggiano S, Ferrante A, Armida M, Martire A, et al. Unbalance of CB1 receptors expressed in GABAergic and glutamatergic neurons in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2012;45(3):983-91.
- (54) Jamwal S, Singh S, Kaur N, Kumar P. Protective Effect of Spermidine Against Excitotoxic Neuronal Death Induced by Quinolinic Acid in Rats: Possible Neurotransmitters and Neuroinflammatory Mechanism. *Neurotox Res* 2015;28(2):171-84.
- (55) Wojtowicz AM, Dvorzhak A, Semtner M, Grantyn R. Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Front Neural Circuits* 2013;7:188-200.
- (56) Bouhouche A, Regragui W, Lamghari H, Khaldi K, Birouk N, Lytim S, et al. Clinical and genetic data of Huntington disease in Moroccan patients. *Afr Health Sci* 2015;15(4):1232-8.
- (57) Fischer CA, Licht EA, Mendez MF. The neuropsychiatric manifestations of Huntington's disease-like 2. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2012;24(4):489-92.
- (58) Jhanjee A, Anand KS, Bajaj BK. Hypersexual features in Huntington's disease. *Singapore Med J* 2011 ;52(6):131-133.
- (59) Kolenc M, Kobal J, Podnar S. Male sexual function in presymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *J Neurol Sci* 2015;359(1-2):312-7.
- (60) Martinez-Horta S, Perez-Perez J, van DE, Fernandez-Bobadilla R, Carceller M, Pagonabarraga J, et al. Neuropsychiatric symptoms are very common in premanifest and early stage Huntington's Disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2016;25:58-64.
- (61) Van den Stock J, De Winter FL, Ahmad R, Sunaert S, Van LK, Vandenberghe W, et al. Functional brain changes underlying irritability in premanifest Huntington's disease. *Hum Brain Mapp* 2015;36(7):2681-90.
- (62) Diamond R, White RF, Myers RH, Mastromauro C, Koroshetz WJ, Butters N, et al. Evidence of presymptomatic cognitive decline in Huntington's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* 1992;14(6):961-75.
- (63) Hubers AA, van DE, Roos RA, Craufurd D, Rickards H, Bernhard LG, et al. Suicidal ideation in a European Huntington's disease population. *J Affect Disord* 2013;151(1):248-58.
- (64) Goodman AO, Rogers L, Pilsworth S, McAllister CJ, Shneerson JM, Morton AJ, et al. Asymptomatic sleep abnormalities are a common early feature in patients with Huntington's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011;11(2):211-7.
- (65) Morton AJ. Circadian and sleep disorder in Huntington's disease. *Exp Neurol* 2013;243:34-44.
- (66) Tereshchenko A, McHugh M, Lee JK, Gonzalez-Alegre P, Crane K, Dawson J, et al. Abnormal Weight and Body Mass Index in Children with Juvenile Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 2015;4(3):231-8.
- (67) Van Raamsdonk JM, Murphy Z, Selva DM, Hamidizadeh R, Pearson J, Petersen A, et al. Testicular degeneration in Huntington disease. *Neurobiol Dis* 2007;26(3):512-20.
- (68) Ellrichmann G, Reick C, Saft C, Linker RA. The role of the immune system in Huntington's disease. *Clin Dev Immunol* 2013;15:1-11.
- (69) Politis M, Lahiri N, Niccolini F, Su P, Wu K, Giannetti P, et al. Increased central microglial activation

- associated with peripheral cytokine levels in premanifest Huntington's disease gene carriers. *Neurobiol Dis* 2015;83:115-21.
- (70) Valekova I, Jarkovska K, Kotrcova E, Bucci J, Ellederova Z, Juhas S, et al. Revelation of the IFNalpha, IL-10, IL-8 and IL-1beta as promising biomarkers reflecting immuno-pathological mechanisms in porcine Huntington's disease model. *J Neuroimmunol* 2016;293:71-81.
- (71) Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Guridi J., Alvarez-Erviti L, Obeso JA. Características clínicas y fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. Base anatomofuncional. In: Grandas FJ, Obeso JA, Tolosa ES, editors. *Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson*. 3^{er}Eds: Grandas FJ^a Edición ed. Madrid: 2004. p. 27-38.
- (72) Alheid GF, Heimart L, Switzer RC. Basal Ganglia. In: Ed.: Paxinos G.(Academic Press), editor. *The Human Nervous System*. San Diego: 1990. p. 483-582.
- (73) Bentivoglio M, Morelli M. The Organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In: Dunnett SB, Bentivoglio M, Björklund A, Hökfelt T, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier BV; 2005. p. 1-43.
- (74) DeLong M, Wichmann T. Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clin EEG Neurosci* 2010;41(2):61-7.
- (75) Groenewegen HJ. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 2003;10(1-2):107-20.
- (76) Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989 ;12(10):366-75.
- (77) DeLong MR, Wichmann T. Basal Ganglia Circuits as Targets for Neuromodulation in Parkinson Disease. *JAMA Neurol* 2015;72(11):1354-60.
- (78) Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000;23(10 Suppl):S8-19.
- (79) Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Guridi J, Mewes K, Chockkman V, Vitek J, et al. The subthalamic nucleus in Parkinson's disease: somatotopic organization and physiological characteristics. *Brain* 2001;124(9):1777-90.
- (80) Lehericy S, Benali H, Van de Moortele PF, Pelegrini-Issac M, Waechter T, Ugurbil K, et al. Distinct basal ganglia territories are engaged in early and advanced motor sequence learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(35):12566-71.
- (81) Obeso JA, Lanciego JL. Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 2011;5:39-44.
- (82) DeLong M, Wichmann T. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:237-40.
- (83) Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 2002;43(2):111-7.
- (84) Wichmann T, De Long MR. Physiology of Basal Ganglia and pathophysiology of Movement Disorders of Basal Ganglia. In: Wats RL, Koller WC, editors. *Movement Disorders*. New York: Eds (McGraw Hill); 1997;40:87-98.
- (85) Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E. The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 1979;187(2):261-83.

- (86) Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovín H, Abeles M, et al. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci* 1998;21(1):32-8.
- (87) Kelly RM, Strick PL. Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog Brain Res* 2004;143:449-59.
- (88) Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 1992 ;15(4):133-9.
- (89) Storey E, Beal MF. Neurochemical substrates of rigidity and chorea in Huntington's disease. *Brain* 1993 Oct;116(Pt 5):1201-22.
- (90) Smith Y, Kieval JZ. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 2000;23(10 Suppl):S28-S33.
- (91) Deng YP, Albin RL, Penney JB, Young AB, Anderson KD, Reiner A. Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 2004 ;27(3):143-64.
- (92) Deng YP, Wong T, Bricker-Anthony C, Deng B, Reiner A. Loss of corticostriatal and thalamostriatal synaptic terminals precedes striatal projection neuron pathology in heterozygous Q140 Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* 2013;60:89-107.
- (93) Deng YP, Wong T, Wan JY, Reiner A. Differential loss of thalamostriatal and corticostriatal input to striatal projection neuron types prior to overt motor symptoms in the Q140 knock-in mouse model of Huntington's disease. *Front Syst Neurosci* 2014;8:198-212.
- (94) Bochicchio A, Rossetti G, Tabarrini O, Kraubeta S, Carloni P. Molecular view of ligands specificity for CAG repeats in anti-Huntington therapy. *J Chem Theory Comput* 2015;11(10):4911-22.
- (95) Ramos EM, Gillis T, Mysore JS, Lee JM, Alonso I, Gusella JF, et al. Prevalence of Huntington's disease gene CAG trinucleotide repeat alleles in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2015;17(4):403-8.
- (96) Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 2000;60(5):409-70.
- (97) Rub U, Vonsettel JP, Heinsen H, Korf HW. The Neuropathology of Huntington's disease: classical findings, recent developments and correlation to functional neuroanatomy. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015;217:1-146.
- (98) Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol Rep* 2010 ;62(1):1-14.
- (99) Zuccato C, Cattaneo E. Huntington's disease. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:357-409.
- (100) Brustovetsky T, Purl K, Young A, Shimizu K, Dubinsky JM. Dearth of glutamate transporters contributes to striatal excitotoxicity. *Exp Neurol* 2004;189(2):222-30.
- (101) Tkac I, Keene CD, Pfeuffer J, Low WC, Gruetter R. Metabolic changes in quinolinic acid-lesioned rat striatum detected non-invasively by in vivo (1)H NMR spectroscopy. *J Neurosci Res* 2001;66(5):891-8.
- (102) Jiang R, Diaz-Castro B, Looger LL, Khakh BS. Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. *J Neurosci* 2016;36(12):3453-70.
- (103) Reynolds GP, Pearson SJ. Glutamate in Huntington's disease. *Lancet* 1994;344(8916):189-90.

- (104) Schoepp DD, Johnson BG. Metabotropic glutamate receptor modulation of cAMP accumulation in the neonatal rat hippocampus. *Neuropharmacology* 1993;32(12):1359-65.
- (105) Ravenscroft P, Brotchie J. NMDA receptors in the basal ganglia. *J Anat* 2000;196(4):577-85.
- (106) Chesnoy-Marchais D, Barthe JY. Voltage-dependent block of NMDA responses by 5-HT agonists in ventral spinal cord neurones. *Br J Pharmacol* 1996;117(1):133-41.
- (107) Kemp JA, Foster AC, Leeson PD, Priestley T, Tridgett R, Iversen LL, et al. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(17):6547-50.
- (108) Weiss JH, Hartley DM, Koh J, Choi DW. The calcium channel blocker nifedipine attenuates slow excitatory amino acid neurotoxicity. *Science* 1990;247(4949):1474-7.
- (109) Beal MF. Molecular mechanisms of excitotoxicity. Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. *Acad Biomed Drug Res: Basel, Karger.*; 1994. p. 102-107.
- (110) Estrada Sanchez AM, Mejia-Toiber J, Massieu L. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res* 2008;39(3):265-76.
- (111) Pierozan P, Goncalves FC, Ferreira F, Pessoa-Pureur R. Acute intrastriatal injection of quinolinic acid provokes long-lasting misregulation of the cytoskeleton in the striatum, cerebral cortex and hippocampus of young rats. *Brain Res* 2014;1577:1-10.
- (112) Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992;31(2):119-30.
- (113) Grunewald T, Beal MF. Bioenergetics in Huntington's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:203-13.
- (114) Naseri NN, Xu H, Bonica J, Vonsattel JP, Cortes EP, Park LC, et al. Abnormalities in the tricarboxylic Acid cycle in Huntington disease and in a Huntington disease mouse model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015 ;74(6):527-37.
- (115) Jozefovicova M, Herynek V, Jiru F, Dezortova M, Juhasova J, Juhas S, et al. Minipig model of Huntington's disease: (1)H magnetic resonance spectroscopy of the brain. *Physiol Res* 2016;65(1):155-63.
- (116) Deckel AW. Nitric oxide and nitric oxide synthase in Huntington's disease. *J Neurosci Res* 2001;64(2):99-107.
- (117) Leszek J, Barreto GE, Gasiorowski K, Koutsouraki E, Avila-Rodrigues M, Aliev G. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2016;15(3):329-36.
- (118) Davies S, Ramsden DB. Huntington's disease. *Mol Pathol* 2001;54(6):409-13.
- (119) La Fontaine MA, Geddes JW, Banks A, Butterfield DA. 3-nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Res* 2000 Mar 10;858(2):356-62.
- (120) Marsman A, Mandl RC, Klomp DW, Bohlken MM, Boer VO, Andreychenko A, et al. GABA and glutamate in schizophrenia: a 7 T (1)H-MRS study. *Neuroimage Clin* 2014;6:398-407.
- (121) Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2013;698(1-3):6-18.

- (122) Coyle JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 1976;263(5574):244-6.
- (123) Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 1991;11(6):1649-59.
- (124) Barker R, Dunnett SB. Ibotenic acid lesions of the striatum reduce drug-induced rotation in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Brain Res* 1994;101(3):365-74.
- (125) Hantraye P, Riche D, Maziere M, Isacson O. A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* 1990 ;108(2):91-104.
- (126) Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 1986;321(6066):168-71.
- (127) Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981;21:165-204.:165-204.
- (128) Albin RL, Young AB, Penney JB, Handelin B, Balfour R, Anderson KD, et al. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N Engl J Med* 1990;322(18):1293-8.
- (129) Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 1992;42(4):733-8.
- (130) Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure LS, Penney JB, Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 1992;46(1):35-48.
- (131) Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995 ;15(4):961-73.
- (132) Beal MF, Brouillet E, Jenkins BC, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993;13:4181-92.
- (133) Borlongan CV, Koutouzis TK, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res* 1995;697(1-2):254-7.
- (134) Hamilton BF, Gould DH. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol* 1987;72(3):286-97.
- (135) Gould DH, Gustine DL. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropionic acid. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982;8(5):377-93.
- (136) Zorumski CF, Olney JW. Excitotoxic neuronal damage and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Ther* 1993 ;59(2):145-62.
- (137) Parker JA, Connolly JB, Wellington C, Hayden M, Dausset J, Neri C. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(23):13318-23.
- (138) Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, et al. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 2001;413(6857):739-43.

- (139) Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 2003;465(1):11-26.
- (140) Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, et al. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 1999;8(3):397-407.
- (141) Slow EJ, van RJ, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 2003;12(13):1555-67.
- (142) Jacobsen JC, Bawden CS, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Reid SJ, Waldvogel HJ, et al. An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet* 2010;19(10):1873-82.
- (143) Reid SJ, Patassini S, Handley RR, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Osmand A, et al. Further molecular characterisation of the OVT73 transgenic sheep model of Huntington's disease identifies cortical aggregates. *J Huntingtons Dis* 2013;2(3):279-95.
- (144) Yang D, Wang CE, Zhao B, Li W, Ouyang Z, Liu Z, et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet* 2010;19(20):3983-94.
- (145) Yang SH, Cheng PH, Banta H, Piotrowska-Nitsche K, Yang JJ, Cheng EC, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 2008;453(7197):921-4.
- (146) Czeredys M, Gruszczynska-Biegala J, Schacht T, Methner A, Kuznicki J. Expression of genes encoding the calcium signalosome in cellular and transgenic models of Huntington's disease. *Front Mol Neurosci* 2013;6:42-55.
- (147) Gonzales ED, Tanenhaus AK, Zhang J, Chaffee RP, Yin JC. Early-onset sleep defects in Drosophila models of Huntington's disease reflect alterations of PKA/CREB signaling. *Hum Mol Genet* 2016;25(5):837-52.
- (148) Lewis EA, Smith GA. Using Drosophila models of Huntington's disease as a translatable tool. *J Neurosci Methods* 2016;265:89-98.
- (149) Morton AJ, Avanzo L. Executive decision-making in the domestic sheep. *PLoS One* 2011;6(1):e15752.
- (150) Desamericq G, Youssov K, Charles P, Saleh N, Olivier A, Sherer-Gagou C, et al. Guidelines for clinical pharmacological practices in Huntington's disease. *Rev Neurol* 2016;172(8-9):423-432.
- (151) Frank S, Testa CM, Stamler D, Kayson E, Davis C, Edmondson MC, et al. Effect of Deutetrabenazine on Chorea Among Patients With Huntington Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;316(1):40-50.
- (152) Geva M, Kusko R, Soares H, Fowler KD, Birnberg T, Barash S, et al. Pridopidine activates neuroprotective pathways impaired in Huntington Disease. *Hum Mol Genet* 2016;25(18):3975-3987.
- (153) Mestre TA, Sampaio C. Huntington Disease: Linking Pathogenesis to the Development of Experimental Therapeutics. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17(2):18-0711.
- (154) Alberch J, Perez-Navarro E, Canals JM. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 2002;57(6):817-22.
- (155) Perez-Navarro E, Canudas AM, Akerund P, Alberch J, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem* 2000;75(5):2190-9.
- (156) Ma H, Yu B, Kong L, Zhang Y, Shi Y. Neural stem cells over-expressing brain-derived neurotrophic factor

- (BDNF) stimulate synaptic protein expression and promote functional recovery following transplantation in rat model of traumatic brain injury. *Neurochem Res* 2012;37(1):69-83.
- (157) Valdeolivas S, Navarrete C, Cantarero I, Bellido ML, Munoz E, Sagredo O. Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice. *Neurotherapeutics* 2015;12(1):185-99.
- (158) Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, Zhang WH, Lou L, Jin X. Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *J Int Med Res* 2011;39(2):488-98.
- (159) Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 2003;23(28):9418-27.
- (160) Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, et al. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 1999;399(6733):263-7.
- (161) Karpuj MV, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, et al. Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat Med* 2002;8(2):143-9.
- (162) Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2004;10(2):148-54.
- (163) Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(16):5820-5.
- (164) Mantha N, Das SK, Das NG. RNAi-based therapies for Huntington's disease: delivery challenges and opportunities. *Ther Deliv* 2012;3(9):1061-76.
- (165) McBride JL, Pitzer MR, Boudreau RL, Dufour B, Hobbs T, Ojeda SR, et al. Preclinical safety of RNAi-mediated HTT suppression in the rhesus macaque as a potential therapy for Huntington's disease. *Mol Ther* 2011 Dec;19(12):2152-62.
- (166) Olson SD, Kambal A, Pollock K, Mitchell GM, Stewart H, Kalomoiris S, et al. Examination of mesenchymal stem cell-mediated RNAi transfer to Huntington's disease affected neuronal cells for reduction of huntingtin. *Mol Cell Neurosci* 2012;49(3):271-81.
- (167) Takahashi M, Suzuki M, Fukuoka M, Fujikake N, Watanabe S, Murata M, et al. Normalization of Overexpressed alpha-Synuclein Causing Parkinson's Disease By a Moderate Gene Silencing With RNA Interference. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015;4: 1-10.
- (168) Quinn N, Brown R, Craufurd D, Goldman S, Hodges J, Kieburz K, et al. Core Assessment Program for Intracerebral Transplantation in Huntington's Disease (CAPIT-HD). *Mov Disord* 1996;11(2):143-50.
- (169) Bachoud-Levi AC, Perrier AL. Regenerative medicine in Huntington's disease: current status on fetal grafts and prospects for the use of pluripotent stem cell. *Rev Neurol (Paris)* 2014;170(12):749-62.
- (170) Drouin-Ouellet J. The potential of alternate sources of cells for neural grafting in Parkinson's and Huntington's disease. *Neurodegener Dis Manag* 2014;4(4):297-307.
- (171) Madrazo I, Franco-Bourland RE, Cuevas C. Fetal Neural grafting for the treatment of Huntington' Disease (HD)-report of the first case. *Soc Neurosci Abstr* 1991;17:902-91.

- (172) Sramka M, Rattaj M, Molina H, Vojtassak J, Belan V, Ruzicky E. Stereotactic technique and pathophysiological mechanisms of neurotransplantation in Huntington's chorea. *Stereotact Funct Neurosurg* 1992;58(1-4):79-83.
- (173) Sramka M, Pogady P, Csokova Z, Pogady J. [Long-term results in patients with stereotaxic surgery for psychopathologic disorders]. *Bratisl Lek Listy* 1992;93(7):364-6.
- (174) Shannon KM, Kordower JH. Neural transplantation for Huntington's disease: experimental rationale and recommendations for clinical trials. *Cell Transplant* 1996;5(2):339-52.
- (175) Bachoud-Levi A, Bourdet C, Brugieres P, Nguyen JP, Grandmougin T, Haddad B, et al. Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol* 2000;161(1):194-202.
- (176) Bachoud-Levi AC, Gaura V, Brugieres P, Lefaucheur JP, Boisse MF, Maison P, et al. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 2006;5(4):303-9.
- (177) Freeman TB, Hauser RA, Sanberg PR, Saporta S. Neural transplantation for the treatment of Huntington's disease. *Prog Brain Res* 2000;127:405-11.
- (178) Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, et al. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 2000;356(9246):1975-9.
- (179) Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 2000;9(2):273-8.
- (180) Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, et al. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 1997;386(6623):395-9.
- (181) Liu JA, Cheung M. Neural crest stem cells and their potential therapeutic applications. *Dev Biol* 2016;419(2):199-216.
- (182) Wang Q, Hong P, Gao H, Chen Y, Yang Q, Jiang M, et al. An interneuron progenitor maintains neurogenic potential in vivo and differentiates into GABAergic interneurons after transplantation in the postnatal rat brain. *Sci Rep* 2016;6:1-12.
- (183) Monni E, Cusulin C, Cavallaro M, Lindvall O, Kokaia Z. Human fetal striatum-derived neural stem (NS) cells differentiate to mature neurons in vitro and in vivo. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014;9(4):338-46.
- (184) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3908-13.
- (185) Abbas OL, Borman H, Uysal CA, Gonen ZB, Aydin L, Helvacioğlu F, et al. Adipose-Derived Stem Cells Enhance Axonal Regeneration through Cross-Facial Nerve Grafting in a Rat Model of Facial Paralysis. *Plast Reconstr Surg* 2016;138(2):387-96.
- (186) Kuwatsuka Y, Kanda J, Yamazaki H, Mori T, Miyamura K, Kako S, et al. A Comparison of Outcomes for Cord Blood Transplant and Unrelated Bone Marrow Transplant in Adult Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(10):1836-43.
- (187) Lee JC, Cha CI, Kim DS, Choe SY. Notice of Retraction: Therapeutic Effects of Umbilical Cord Blood Derived Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium on Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *J Pathol Transl Med* 2016;49(6):472-80.

- (188) Wang J, Hao H, Huang H, Chen D, Han Y, Han W. The Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Full-Thickness Skin Grafts. *Biomed Res Int* 2016;7:1-10.
- (189) Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytherapy* 2001;3(5):393-6.
- (190) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61(4):364-70.
- (191) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290(5497):1779-82.
- (192) Hasan A, Deeb G, Rahal R, Atwi K, Mondello S, Marei HE, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Front Neurol* 2017;8:28-43.
- (193) Cox CS, Jr., Hetz RA, Liao GP, Aertker BM, Ewing-Cobbs L, Juranek J, et al. Treatment of Severe Adult Traumatic Brain Injury Using Bone Marrow Mononuclear Cells. *Stem Cells* 2016; 35(4):1065-1079.
- (194) Chen J, Yang Y, Shen L, Ding W, Chen X, Wu E, et al. Hypoxic Preconditioning Augments the Therapeutic Efficacy of Bone Marrow Stromal Cells in a Rat Ischemic Stroke Model. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;doi:10.1007/s10571-016-0445-1.
- (195) Lescaudron L, Unni D, Dunbar GL. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. *Int J Neurosci* 2003;113(7):945-56.
- (196) National Research Council (US). National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Care and Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research. I ed. Washington DC: National Academies Press (U.S.); 2003.
- (197) Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier; 2006.
- (198) Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(14):7841-5.
- (199) Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 1970;24(3):485-93.
- (200) Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 1991;36(2-3):219-28.
- (201) Blanco Lezcano L, Lorigados Pedre L, Ferandez Verdecia CI, Serrano Sánchez T, Pavón Fuentes N, Francis Turner L. Modify Beam Transversal Test to Evaluate Hemiparkinsonian Rats. *Acta Biológica Colombiana* 2010;15(2):189-202.
- (202) Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 2010;215(2):244-54.
- (203) Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984;11(1):47-60.
- (204) Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15(3):532-7.
- (205) Ehara A, Ueda S. Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta Histochem Cytochem* 2009;42(6):171-9.

- (206) ImageJ [computer program]. Version 1.34s National Institutes of Health; 2006.
- (207) Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 1994;25(9):1862-9.
- (208) Afanador L, Yarosh H, Wang J, Ali SF, Angulo JA. Contrasting Effects of the Neuropeptides Substance P, Somatostatin, and Neuropeptide Y on the Methamphetamine-Induced Production of Striatal Nitric Oxide in Mice. *J Drug Alcohol Res* 2012;doi:10.4303/jdar/235604
- (209) Wasilewska B, Robak A, Rowniak M, Bogus-Nowakowska K, Najdzion J, Zakowski W, et al. Distribution and chemical coding pattern of somatostatin immunoreactivity in the dorsal striatum of the guinea pig. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49(4):690-9.
- (210) Hanbury R, Chen EY, Wu J, Kordower JH. Knockout of p75NTR does not alter the viability of striatal neurons following a metabolic or excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* 2003;20(2):93-102.
- (211) Perez-De La Cruz V, Elinos-Calderon D, Robledo-Arratia Y, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Ali SF, et al. Targeting oxidative/nitroergic stress ameliorates motor impairment, and attenuates synaptic mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in two models of Huntington's disease. *Behav Brain Res* 2009;199(2):210-7.
- (212) Francis L, Cruz R, Antunez I, Rosillo JC. [Behavior characterization of a model of Huntington's disease in rats, induced by quinolinic acid]. *Rev Neurol* 2000;30(11):1016-21.
- (213) Pierozan P, Ferreira F, de Lima BO, Pessoa-Pureur R. Quinolinic acid induces disrupts cytoskeletal homeostasis in striatal neurons. Protective role of astrocyte-neuron interaction. *J Neurosci Res* 2015 ;93(2):268-84.
- (214) Alrefaei GI, Ayuob NN, Ali SS, Al-Karim S. Effects of maternal age on the expression of mesenchymal stem cell markers in the components of human umbilical cord. *Folia Histochem Cytobiol* 2015;53(3):259-71.
- (215) 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.
- (216) Hamouda H, Ullah M, Berger M, Sittinger M, Tauber R, Ringe J, et al. N-glycosylation profile of undifferentiated and adipogenically differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells: towards a next generation of stem cell markers. *Stem Cells Dev* 2013;22(23):3100-13.
- (217) Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vazquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;144(1-2):147-54.
- (218) Sosnova M, Bradl M, Forrester JV. CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells* 2005;23(4):507-15.
- (219) Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* 2009;10:29-10.
- (220) Xu M, Zhang B, Liu Y, Zhang J, Sheng H, Shi R, et al. The immunologic and hematopoietic profiles of mesenchymal stem cells derived from different sections of human umbilical cord. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014;46(12):1056-65.
- (221) Panaroni C, Tzeng YS, Saeed H, Wu JY. Mesenchymal progenitors and the osteoblast lineage in bone marrow hematopoietic niches. *Curr Osteoporos Rep* 2014;12(1):22-32.

- (222) Jeanblanc C, Goodrich AD, Colletti E, Mokhtari S, Porada CD, Zanjani ED, et al. Temporal definition of haematopoietic stem cell niches in a large animal model of in utero stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2014;166(2):268-78.
- (223) Tian C, Zhang Y. Purification of hematopoietic stem cells from bone marrow. *Ann Hematol* 2016;95(4):543-7.
- (224) Sohni A, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24(1):3-11.
- (225) Subramanian K, Geraerts M, Pauwelyn KA, Park Y, Owens DJ, Muijtjens M, et al. Isolation procedure and characterization of multipotent adult progenitor cells from rat bone marrow. *Methods Mol Biol* 2010;636:55-78.
- (226) Ma C, Guo Y, Liu H, Wang K, Yang J, Li X, et al. Isolation and Biological Characterization of a novel type of Pulmonary Mesenchymal Stem Cells derived from Wuzhishan Miniature pig embryo. *Cell Biol Int* 2016; 40(10):1041-9.
- (227) Macri-Pellizzeri L, Pelacho B, Sancho A, Iglesias-Garcia O, Simon-Yarza AM, Soriano-Navarro M, et al. Substrate stiffness and composition specifically direct differentiation of induced pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part A* 2015;21(9-10):1633-41.
- (228) Prosper F, Verfaillie CM. [Adult stem cells]. *An Sist Sanit Navar* 2003;26(3):345-56.
- (229) Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010;2(6):640-53.
- (230) Gipson CD, Olive MF. Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior?. *Genes Brain Behav* 2016;16(1):101-117.
- (231) Hardwick LJ, Philpott A. Nervous decision-making: to divide or differentiate. *Trends Genet* 2014;30(6):254-61.
- (232) Ismail FY, Fatemi A, Johnston MV. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *Eur J Paediatr Neurol* 2016; 21(1):23-48.
- (233) Van Raamsdonk JM, Warby SC, Hayden MR. Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. *Brain Res Bull* 2007;72(2-3):124-31.
- (234) Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci* 1996;16(15):4604-16.
- (235) Lescaudron L. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's Disease: Behavioural and morphological outcomes. *J Neurosci* 2003;113:945-56.
- (236) Rossignol J, Fink K, Davis K, Clerc S, Crane A, Matchynski J, et al. Transplants of adult mesenchymal and neural stem cells provide neuroprotection and behavioral sparing in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Stem Cells* 2014;32(2):500-9.
- (237) Levivier M, Pearlman SH, Gash DM, Brotchi J. [Protective effect of intrastriatal grafts in an experimental model of Huntington's disease. Behavioral and morphological correlation]. *Neurochirurgie* 1991;37(3):148-59.
- (238) Blanco L, Pavon N, Macias R, Castillo L, Diaz C, Garcia A, et al. [Simultaneous micro-transplantation of fetal mesencephalic cells to the striate and substantia nigra pars reticulata in hemi-parkinsonian rats. A study of behavior]. *Rev Neurol* 2000;30(12):1122-7.

- (239) Cicchetti F, Soulet D, Freeman TB. Neuronal degeneration in striatal transplants and Huntington's disease: potential mechanisms and clinical implications. *Brain* 2011;134(3):641-52.
- (240) Ross CA, Akimov SS. Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 2014;23:17-26.
- (241) Fink KD, Rossignol J, Lu M, Leveque X, Hulse TD, Crane AT, et al. Survival and differentiation of adenovirus-generated induced pluripotent stem cells transplanted into the rat striatum. *Cell Transplant* 2014;23(11):1407-23.
- (242) Cicchetti F, Saporta S, Hauser RA, Parent M, Saint-Pierre M, Sanberg PR, et al. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(30):12483-8.
- (243) Armstrong RJ, Watts C, Svendsen CN, Dunnett SB, Rosser AE. Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 2000;9(1):55-64.
- (244) Ma L, Hu B, Liu Y, Vermilyea SC, Liu H, Gao L, et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. *Cell Stem Cell* 2012;10(4):455-64.
- (245) Schwarcz R, Fuxe K, Agnati LF, Hokfelt T, Coyle JT. Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* 1979;170(3):485-95.
- (246) Fuxe K, Janson AM, Jansson A, Andersson K, Eneroth P, Agnati LF. Chronic nicotine treatment increases dopamine levels and reduces dopamine utilization in substantia nigra and in surviving forebrain dopamine nerve terminal systems after a partial di-mesencephalic hemitransection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990;341(3):171-81.
- (247) Rossignol J, Fink KD, Crane AT, Davis KK, Bombard MC, Clerc S, et al. Reductions in behavioral deficits and neuropathology in the R6/2 mouse model of Huntington's disease following transplantation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells is dependent on passage number. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(1):9-21.
- (248) Whishaw IQ, Dringenberg HC, Pellis SM. Spontaneous forelimb grasping in free feeding by rats: motor cortex aids limb and digit positioning. *Behav Brain Res* 1992;48(2):113-25.
- (249) Montoya CP, Astell S, Dunnett SB. Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rat. *Prog Brain Res* 1990;82:459-66.:459-66.
- (250) Dobrossy MD, Dunnett SB. Morphological and cellular changes within embryonic striatal grafts associated with enriched environment and involuntary exercise. *Eur J Neurosci* 2006;24(11):3223-33.
- (251) Roberts TJ, Price J, Williams SC, Mado M. Preservation of striatal tissue and behavioral function after neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2006;139(4):1187-99.
- (252) Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 1999;19(8):3248-57.
- (253) Mehrotra A, Sandhir R. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behav Brain Res* 2014;261:345-55.
- (254) Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp* 2011;(49):2376-79.

- (255) Sawers A, Ting LH. Beam walking can detect differences in walking balance proficiency across a range of sensorimotor abilities. *Gait Posture* 2015;41(2):619-23.
- (256) Lin YT, Chern Y, Shen CK, Wen HL, Chang YC, Li H, et al. Human mesenchymal stem cells prolong survival and ameliorate motor deficit through trophic support in Huntington's disease mouse models. *PLoS One* 2011;6(8):22924-41.
- (257) McBride JL, Behrstock SP, Chen EY, Jakel RJ, Siegel I, Svendsen CN, et al. Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol* 2004;475(2):211-9.
- (258) Havekes R, Abel T, Van der Zee EA. The cholinergic system and neostriatal memory functions. *Behav Brain Res* 2011;221(2):412-23.
- (259) Abada YS, Nguyen HP, Schreiber R, Ellenbroek B. Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel BACHD transgenic rat model for huntington disease. *PLoS One* 2013;8(7):68584-96.
- (260) Bengoetxea X, Rodriguez-Perdigon M, Ramirez MJ. Object recognition test for studying cognitive impairments in animal models of Alzheimer's disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 2015;7:10-29.:10-29.
- (261) Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 2012;13(2):93-110.
- (262) Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(5):1055-70.
- (263) Ahmado A, Carr AJ, Vugler AA, Semo M, Gias C, Lawrence JM, et al. Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(10):7148-59.
- (264) Yang YR, Song S, Hwang H, Jung JH, Kim SJ, Yoon S, et al. Memory and synaptic plasticity are impaired by dysregulated hippocampal O-GlcNAcylation. *Sci Rep* 2017;7:44921-30.
- (265) Stanley JA, Burgess A, Khatib D, Ramaseshan K, Arshad M, Wu H, et al. Functional dynamics of hippocampal glutamate during associative learning assessed with in vivo 1H functional magnetic resonance spectroscopy. *Neuroimage* 2017;(17)153:189-197.
- (266) Bringas ML, Suarez C, Sanchez C, Alvarez LM, Valdes P, Salazar S, et al. Cognitive changes after stem cell transplantation in a patient with subcortical stroke. *BMJ Case Rep* 2011; doi: 10.1136/bcr.03.2011.3944.
- (267) Liu Y, Zhang X, Dai Y, Shu C, Qu P, Liu YX, et al. [Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on learning and memory functional recovery in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2008;46(9):648-53.
- (268) Huang W, Mo X, Qin C, Zheng J, Liang Z, Zhang C. Transplantation of differentiated bone marrow stromal cells promotes motor functional recovery in rats with stroke. *Neurol Res* 2013;35(3):320-8.
- (269) Jang DK, Park SI, Han YM, Jang KS, Park MS, Chung YA, et al. Motor-evoked potential confirmation of functional improvement by transplanted bone marrow mesenchymal stem cell in the ischemic rat brain. *J Biomed Biotechnol* 2011; doi:10.1155/2011/238409.
- (270) Frausin S, Viventi S, Verga FL, Quattromani MJ, Leanza G, Tommasini A, et al. Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem* 2015;117(4-5):329-38.
- (271) Thompson LH, Bjorklund A. Reconstruction of brain circuitry by neural transplants generated from

- pluripotent stem cells. *Neurobiol Dis* 2015;79:28-40.
- (272) Zhao F, Qu Y, Liu H, Du B, Mu D. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-modified by TERT and BDNF: a novel neuroprotective therapy for neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Dev Neurosci* 2014 ;38:147-54.
- (273) Chopin V, Lagadec C, Toillon RA, Le B, X. Neurotrophin signaling in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(9):1859-70.
- (274) Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:223-50.
- (275) Garcia R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuetara K, Pavon N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(3):753-4.
- (276) Zhao LX, Zhang J, Cao F, Meng L, Wang DM, Li YH, et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. *Exp Neurol* 2004;190(2):396-406.
- (277) Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 2009;5(6):311-22.
- (278) Zuccato C, Marullo M, Vitali B, Tarditi A, Mariotti C, Valenza M, et al. Brain-derived neurotrophic factor in patients with Huntington's disease. *PLoS One* 2011;6(8):22966-76.
- (279) Brito V, Puigdellivol M, Giralt A, del TD, Alberch J, Gines S. Imbalance of p75(NTR)/TrkB protein expression in Huntington's disease: implication for neuroprotective therapies. *Cell Death Dis* 2013;4(4):595-610.
- (280) Cortese GP, Barrientos RM, Maier SF, Patterson SL. Aging and a peripheral immune challenge interact to reduce mature brain-derived neurotrophic factor and activation of TrkB, PLCgamma1, and ERK in hippocampal synaptoneurosomes. *J Neurosci* 2011;31(11):4274-9.
- (281) Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001;293(5529):493-8.
- (282) Reiner A, Wang HB, Del MN, Sakata K, Yoo W, Deng YP. BDNF may play a differential role in the protective effect of the mGluR2/3 agonist LY379268 on striatal projection neurons in R6/2 Huntington's disease mice. *Brain Res* 2012;1473:161-72.
- (283) Jiao Y, Palmgren B, Novozhilova E, Englund JU, Spieles-Engemann AL, Kale A, et al. BDNF Increases Survival and Neuronal Differentiation of Human Neural Precursor Cells Cotransplanted with a Nanofiber Gel to the Auditory Nerve in a Rat Model of Neuronal Damage. *Biomed Res Int* 2014; doi: 10.1155/2014/356415.
- (284) Troy CM, Rabacchi SA, Hohl JB, Angelastro JM, Greene LA, Shelanski ML. Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* 2001;21(14):5007-16.
- (285) Rylander D. Restoration of synaptic plasticity in the host striatum: can transplants make it? *Neuroreport* 2013 ;24(18):1016-8.
- (286) Sadan O, Shemesh N, Cohen Y, Melamed E, Offen D. Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases. *Isr Med Assoc J* 2009;11(4):201-4.
- (287) Yoshinori T, Shinji I, Hideto K, Miwako K, Isamu Y, TK. Brain-Derived Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Peripheral Nerve. *PLOS ONE* 2012;7:44592.

- (288) Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* 2004;7(6):596-604.
- (289) Javanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 2000;3:323-9.
- (290) Francelle L, Galvan L, Brouillet E. Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Front Cell Neurosci* 2014;8:295-307.
- (291) Estrada-Sanchez AM, Rebec GV. Role of cerebral cortex in the neuropathology of Huntington's disease. *Front Neural Circuits* 2013;7:19-27.
- (292) Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971;30(1):75-90.
- (293) Mu S, Wang J, Zhou G, Peng W, He Z, Zhao Z, et al. Transplantation of induced pluripotent stem cells improves functional recovery in Huntington's disease rat model. *PLoS One* 2014;9(7):doi: 10.1371/journal.pone.0101185
- (294) Pierozan P, Zamoner A, Soska AK, Silvestrin RB, Loureiro SO, Heimfarth L, et al. Acute intrastriatal administration of quinolinic acid provokes hyperphosphorylation of cytoskeletal intermediate filament proteins in astrocytes and neurons of rats. *Exp Neurol* 2010;224(1):188-96.
- (295) Mohn TC, Koob AO. Adult Astrogenesis and the Etiology of Cortical Neurodegeneration. *J Exp Neurosci* 2015;9(Suppl 2):25-34.
- (296) Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 2015;131(3):323-45.
- (297) Preusser M, Laggner U, Haberler C, Heinzl H, Budka H, Hainfellner JA. Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology* 2006;48(4):438-44.
- (298) Li Y, Blanco GD, Lei Z, Xu ZC. Increased GAD expression in the striatum after transient cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 2010;45(4):370-7.
- (299) Hanno-Iijima Y, Tanaka M, Iijima T. Activity-Dependent Bidirectional Regulation of GAD Expression in a Homeostatic Fashion Is Mediated by BDNF-Dependent and Independent Pathways. *PLoS One* 2015;10(8):doi: 10.1371/journal.pone.0134296.
- (300) Matsumoto T, Numakawa T, Yokomaku D, Adachi N, Yamagishi S, Numakawa Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity. *Mol Cell Neurosci* 2006;31(1):70-84.
- (301) Morreale MK. Huntington's disease: looking beyond the movement disorder. *Adv Psychosom Med* 2015;34:135-42.
- (302) Kumar A, Kumar SS, Kumar V, Kumar D, Agarwal S, Rana MK. Huntington's disease: an update of therapeutic strategies. *Gene* 2015;556(2):91-7.
- (303) Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2004;127(2):319-32.
- (304) Diana García del Barco, Jorge Berlanga, Eduardo Pentón, Orla Hardiman, Enrique Montero. Boosting controlled autoimmunity: a new therapeutic target for CNS disorder. *Expert Rev Neurotherapeutics* 2008;8(5):819-25.

ANEXOS

ANEXO 1

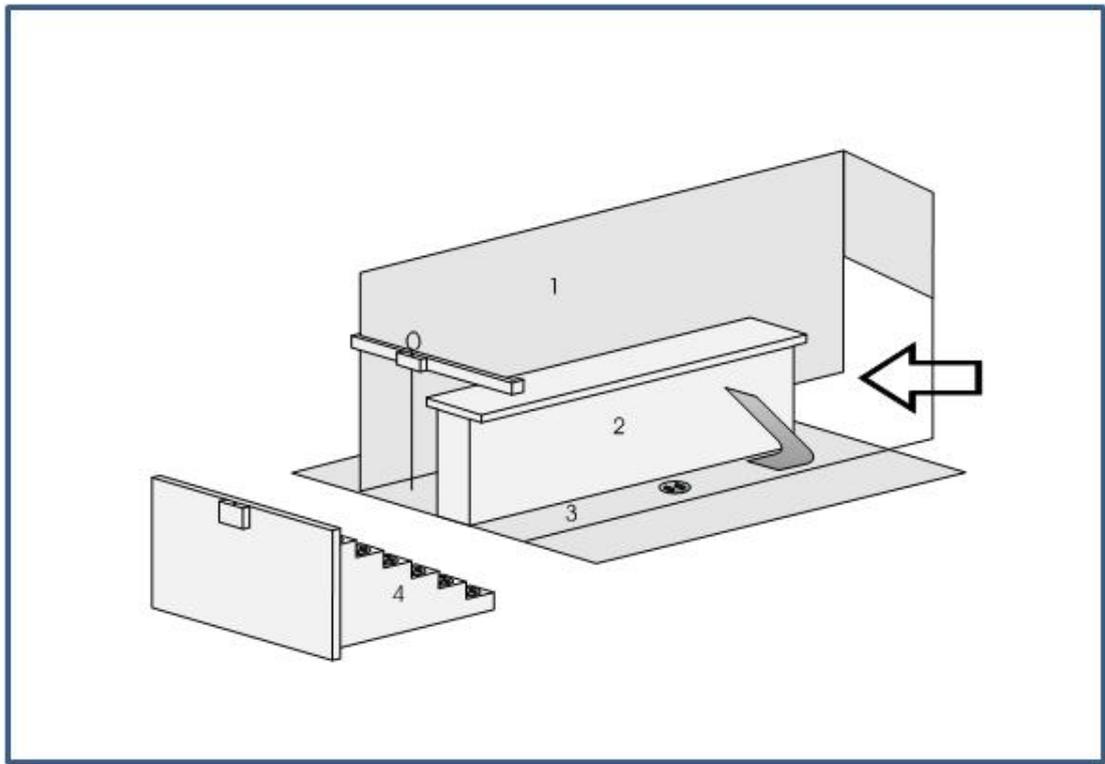
Actividad rotatoria inducida por D-anfetamina

Rata	GE	FL	FRL	ROT	FTp	FRTp	ROT

GE: Grupo experimental, **FL:** Fecha de la lesión, **FRL:** Fecha de la rotación después de la lesión, **ROT:** rotación, **FTp:** Fecha del trasplante, **FRTp:** Fecha de rotación después del trasplante.

ANEXO 2

Representación esquemática de la caja empleada para la realización de la "Prueba de Habilidades Motoras de las Extremidades Anteriores".



1) Caja de Acrílico; 2) Plataforma Central; 3) Espacio a ambos lados para insertar la escalerilla móvil de seis escalones; 4) Escalerilla móvil provista de una pequeña concavidad en cada escalón y en el piso de la caja donde se sitúan dos trozos de alimentos.

ANEXO 4*Prueba de la barra transversal*

Fecha	Rata	Grupo	Barra	Distancia (en cm)

ANEXO 5Prueba de Exploración de Objetos

Grupo experimental	Tiempo (seg) OBJETOS Primer día	Tiempo (seg) OBJETOS Segunda día
SANO (n=10)		

Grupo experimental	Tiempo (seg) OBJETOS Primer día	Tiempo (seg) OBJETOS Segunda día
LAQ (n=10)		

Grupo experimental	Tiempo (seg) OBJETOS Primer día	Tiempo (seg) OBJETOS Segunda día
TpDMEM (n=10)		

Grupo experimental	Tiempo (seg) OBJETOS Primer día	Tiempo (seg) OBJETOS Segunda día
TpCMMO (n=10)		

ANEXOS 6

Prueba del laberinto acuático de Morris (LAM).

Rata:

Grupo:

Fecha:

Nombre del fichero:

Fecha: _____

Posición: SO

Intento	1	2	3	4	5	6	7	8
Inicio	S	O	N	E	O	E	N	S

Fecha: _____

Posición: SO

Intento	1	2	3	4	5	6	7	8
Inicio	E	N	O	S	E	S	O	N

Fecha: _____

Posición: SO

Intento	1	2	3	4	5	6	7	8
Inicio	S	N	E	O	E	S	O	N

Fecha: _____

Posición: SO

Intento	1	2	3	4	5
Inicio	S	E	O	N	S

Fecha: _____

Posición: NE (VISIBLE)

Intento	1	2	3	4	5	6	7	8
Inicio	S	O	E	N	S	O	E	N
Latencia								