

# 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

## Establishment of the conditions for the bone marrow cells transplants in a model of Huntington's disease and functional effect on the motor behavior

*Teresa Serrano Sánchez\**, *Lisette Blanco Lezcano\**, *Esteban Alberti Amador\**,  
*Iván Díaz Armesto\*\**, *Nancy Pavón Fuente\**, *Lourdes Lorigados Pedre\**,  
*María Elena González Fraguela\**, *Jorge Felipe Montero León\*\**,  
*Liliana Francis Turner\*\*\*\**, *Ivette Fernández Verdecia\**

### Resumen

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno degenerativo hereditario que afecta a personas con predisposición genética. No existe hasta hoy un tratamiento efectivo; la enfermedad avanza lentamente y el paciente termina en incapacidad o muerte después de 15 o 20 años. Los estudios relacionados con el tratamiento de las manifestaciones clínicas que aparecen en la enfermedad, incluyen tratamientos medicamentosos y el uso de trasplante de células. En la actualidad se conoce que es posible reproducir algunas características de la enfermedad en modelos experimentales para ensayar posibles terapéuticas (ej. el modelo de lesión estriatal por inyección de ácido quinolínico; [AQ]). No se conoce el efecto restaurativo de las células de médula ósea (CMO) en este modelo. Objetivos: 1) Caracterizar morfológicamente la lesión por inyección intraestriatal de AQ. 2) Caracterizar inmunocitoquímicamente las CMO. 3) Evaluar la concentración óptima de CMO para el trasplante en el modelo y 4) Evaluar el estado funcional del trasplante de CMO, a través de la conducta motora. Resultados: Se estableció la dosis de AQ para lesionar de manera adecuada al estriado, se caracterizaron inmunofenotípicamente las CMO, se estableció la concentración celular óptima para el trasplante de CMO y se realizó la evaluación funcional del trasplante. Conclusiones: 1) La dosis de 1,2 µL de AQ, fue capaz de lesionar adecuadamente el estriado, con una menor afectación de estructuras fuera del estriado. 2) Las CMO fueron positivas para los marcadores CD34, CD38, CD45 y CD90, lo que sugiere que esta población es heterogénea. 3) La mejor concentración de CMO para el trasplante fue la de 100 000 cél/ml, ya que se obtuvo la mejor supervivencia y migración celular. 4) Las pruebas conductuales demostraron una mejoría en la conducta motora en los animales trasplantados con CMO. Este resultado sugiere la importancia de las CMO en el recobrado de las funciones perdidas, lo cual será de gran valor para evaluar este proceder como método terapéutico en los pacientes aquejados de EH.

**Palabras clave:** corteza, enfermedad de Huntington, estriado, modelos experimentales, células de médula ósea, trasplante de células.

\* Centro Internacional de Restauración Neurológica. Ave. 25 No. 15805 entre 158 y 160. Cubanacán, Playa. Código Postal 11300. La Habana, Cuba. Correspondencia a: Teresa Serrano Sánchez, Centro Internacional de Restauración Neurológica. Ave. 25 No. 15805 entre 158 y 160. Cubanacán, Playa. Código Postal 11300. La Habana, Cuba. E-mail: teresa.serrano@infomed.sld.cu Fax: (537) 33 6339/2420/ 6302 Telefax: 33 6028. Teléfonos del CIREN: 271 5353/5379

\*\* Hospital Clínico Quirúrgico "Joaquín Albarrán". Ave. 26. Playa. La Habana, Cuba.

\*\*\* Instituto Nacional de Oncología y Rehabilitación (INOR). 29 y E. Vedado. La Habana, Cuba.

\*\*\*\* Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia.

## Abstract

Huntington Disease (HD) is a heritable neurodegenerative disease that affects people with genetic history. Until today, an effective treatment doesn't exist; the illness advances slowly and the patient finishes in inability or death after 15 or 20 years. The studies related with the treatment of the clinical manifestations, include treatments with medications and the use of cells transplant. At the present time it is known that it is possible to reproduce, some characteristics of the disease in experimental models for to use possible therapies [example: estriatal lesion of quinolínico acid; (QA)]. the restorative effect of the bone marrow cells (BMC) is not known in this model. Objectives. 1) characterization morphofological of the estriatal lesion whith QA. 2) to characterization immunochemical of BMC. 3) to evaluate the BMC concentration for the transplant and 4) to evaluate the functional state of BMC transplant, through the motor behavior. Results. Establishment of the QA dose for to injure the striatum in appropriate way, immunophenotype of BMC was characterized, the good cellular concentration for the BMC transplant was established and was carried out the functional evaluation of the transplant. Conclusions. 1) the dose of 1.2 µL of QA, was able to injure appropriately of striatum, with a smaller affectation of structures striatum outside. 2) the BMC was positive for the markers CD34, CD38, CD45 and CD90, suggesting that this population is heterogeneous. 3) the best BMC concentration for the transplant was that of 100 000 cel / l, with the best survival and cellular migration. 4) we demonstrated an improvement in the motor behavior in the animals with BMC transplanted. This result suggests the importance of the BMC in the recovered of the lost functions and their importance to evaluate it as proceeding therapeutic in the HD.

**Key words:** cortex, Huntington Disease, Striatum, experimental models, Bone Marrow Cells, cells.

**Recibido:** agosto 3 de 2011

**Aprobado:** noviembre 30 de 2011

## Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por una atrofia y pérdida celular progresiva predominantemente en el estriado y la neocorteza (Huntington, 1872; Leegwater-Kim, 2004). El tratamiento de la EH ha abarcado desde el tratamiento etiológico hasta el tratamiento de los síntomas clínicos, tratamientos sustitutos, preventivo-protectores y restauradores, en esta última dirección por más de dos décadas se han desarrollado terapias basadas en la utilización de células, la que se ha sustentado de forma importante en la disponibilidad de modelos para su investigación. En la actualidad los más utilizados son los modelos inducidos por toxinas, que producen patrones de pérdida celular en el cerebro de los animales de experimentación, los cuales permiten simular o reproducir las alteraciones típicas de la enfermedad, tales como las alteraciones conductuales, bioquímicas y patológicas que se observan en la enfermedad en humanos, estos modelos se basan en el mecanismo de excitotoxicidad y en la alteración del metabolismo energético mitocondrial (Coyle, 1976; Mason, 1978; Samberg, 1984; Schwarcz, 1979; Schwarcz, 1983; Borlongan, 1997; Beal, 1993).

Los modelos de excitotoxicidad han sido utilizados con mayor frecuencia para reproducir en parte los cambios bioquímicos y neuropatológicos de la EH, y están basados en la sobreexcitación de las neuronas como resultado de la estimulación propagada y con-

tinua de los receptores a aminoácidos excitadores, lo que produce serias alteraciones en la fisiología de las neuronas, conduciéndolas a la muerte celular (Olney, 1974; Olney, 1971). El ácido quinolínico representante de este grupo afecta a las neuronas espinosas y respecta relativamente a las no espinosas.

(Albin, 1990; Young, 1988). El mecanismo de acción excitotóxico de esta toxina incluye la entrada masiva de calcio a la célula a través del receptor NMDA, provocando 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 de 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 mantener el estado activo del receptor NMDA (Albin, 1990).

Otra clase de modelo experimental en el que se ha puesto gran atención en las últimas décadas es aquel que utiliza un gen mutante, pues permite la generación de ratones transgénicos, los cuales son portadores de las diferentes formas encontradas para este gen (Mangiarini, 1996), reproduciendo alteraciones motoras y en el aprendizaje equivalentes a aquellas que han sido observadas en la EH (Carter, 1999; Lionne, 1999).

En general, todos estos modelos han aportado un cúmulo de evidencias de disfunción y muerte celular que han favorecido el estudio de la causa de los síntomas de la enfermedad (Menalled, 2002).

El avance vertiginoso en los métodos de tratamiento restaurador ha contribuido a que en el presente se trate de encontrar fuentes celulares alternativas no neurales para el trasplante, ya que la fuente de tejido fetal humano, obtenida durante el embarazo y utilizada hasta el momento, requiere de estrictos controles de calidad, sin olvidar los problemas éticos que entrañan su uso, lo cual ha sido motivo de interminables polémicas, rechazos y aspectos legales (Boer, 1994).

### **Fuentes celulares para el trasplante en la EH:**

Recientemente se ha encontrado que la fuente alternativa de tejido para el trasplante neural en la EH, es la célula madre, la que por definición es célula que puede autorrenovarse y diferenciarse de un linaje alternativo para generar una o todas las células y tejidos del cuerpo (Seaberg, 2003).

Además existe una población de células que tienen restricción de linaje, las cuales constituyen las células progenitoras con capacidad limitada para diferenciarse de un tipo celular específico y que también pueden tener importancia para el trasplante clínico (Seaberg, 2003).

Durante varios años se consideró a la célula madre hematopoyética como la única célula de la médula ósea con capacidad regenerativa, y se pensaba que solo era multipotencial. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la composición de la médula ósea es más compleja, pues en ella se ha identificado un grupo heterogéneo de células madre adultas, positivas para las moléculas de superficie celular que se muestran en los tipos siguientes:

- Hematopoyéticas: CD45, CD34, CD11 y CD14
- Mesenquimales (estromales): CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106
- Población lateral: CD34 positiva, pero la mayoría es CD34 negativa, ABCG2
- Células progenitoras adultas multipotentes (MAPC): CD13, SSEA-1, SSEA-4
- Células ovas: CD34 positiva y Lin negativa

La presencia de uno u otro marcador celular tiene gran importancia si tenemos en cuenta que no todas las CMO son multipotentes, sino que las que portan deter-

minados marcadores celulares son las que se pueden diferenciar de un fenotipo neural dado.

Teniendo en cuenta estas observaciones se deduce que existe un número de fuentes potenciales de células progenitoras y madre, que pueden ser utilizadas en 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, las que están parcialmente preparadas para dar origen a un linaje neural, 3) células progenitoras de la zona subventricular adulta, 4) células germinales epidérmicas aisladas de las gónadas de embriones que normalmente están destinadas a convertirse en ovocitos y espermatozoides, 5) células madre no neuronales de sangre del cordón umbilical, colectada después del nacimiento, y 6) otro rango de células madre no neuronales que pueden tener la capacidad de diferenciarse de células neurales cuando se encuentran en un ambiente con señales apropiadas.

Debido al potencial de crecimiento y diferenciación que tienen estas células, demostrado en gran medida en el campo de la investigación, surgen tres preguntas sobre este sistema de células proliferantes:

1. ¿Pueden estas células convertirse en neuronas?
2. ¿Pueden estas células diferenciarse de células semejantes a las estriatales y ser útiles para los estudios de trasplante neural?
3. ¿Pueden estas células sobrevivir cuando son trasplantadas en los modelos que se han diseñado de la EH y tener efecto sobre las funciones perdidas?

Mucho se ha discutido acerca de este tema en la literatura actual y para la mayoría de las fuentes celulares las preguntas 1 y 2 siguen siendo el foco central de los estudios, y sobre la pregunta 3 han aparecido ciertas investigaciones en las cuales se ha intentado dar una respuesta plausible a dicho interrogante (Lescaudron, 2003).

La posibilidad de que la población de células madre, tales como las CMO, puedan ser potencialmente neurogénicas, ha generado importantes estudios que han abierto una oportunidad para el trasplante autólogo, dada la existencia de un fácil acceso de tejido para ser utilizado en el trasplante. Aunque existen reportes de CMO que tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas (Brazelton, 2000), en la literatura se plantean diferentes hipótesis relacionadas con este aspecto, evidenciando que tales resultados han sido consecuencia de diversos eventos de fusión celular (Long, 2003).

Por otra parte, existen reportes en la literatura en los que se ha demostrado que las CMO son capaces de producir factores neurotróficos (FNT) como el BDNF (del inglés Brain Derive Neurotrophic Factor) y el factor de crecimiento nervioso NGF (del inglés Nerve Growth Factor) (Dormady, 2001). Estas células, debido a su potencialidad para producir factores tróficos y generar diferentes tipos de células, podrían ser una fuente ideal para la neuroprotección y restauración celular en enfermedades neurodegenerativas tales como la EH.

### Desarrollo futuro

En la actualidad no existe una terapia efectiva para reparar, reemplazar o proteger la neurodegeneración que aparece en la EH; la estrategia de reemplazo celular y la neuroprotección hasta hoy solo están sustentadas sobre la base de estudios experimentales, en los cuales se busca reparar el daño ofreciendo protección celular generalizada sobre aspectos que no son específicos de una enfermedad neurodegenerativa en particular. Con la identificación de genes se ha ampliado la hipótesis acerca de las causas del proceso patológico en la EH (The Huntington's Disease collaborative Research Group, 1993), pero aún existen pocas evidencias que permiten concluir los mecanismos que subyacen a la mutación genética, los cuales provocan la degeneración focal progresiva de las neuronas estriatales. Sin embargo, se han sugerido nuevas estrategias terapéuticas para normalizar los eventos transcripcionales, los cambios en el metabolismo celular y la respuesta al estrés (The Huntington's Disease collaborative Research Group, 1993), pudiera ser, que estos estudios experimentales identifiquen nuevos tratamientos que puedan ser efectivos en la investigación clínica. Teniendo en cuenta el estado de la temática abordada, se pudo establecer las condiciones para el trasplante de células de médula ósea en un modelo de enfermedad de Huntington y evaluar su efecto funcional a través de la conducta motora.

### Materiales y métodos

#### Diseño experimental

El diseño experimental constó de tres fases:

La primera estuvo relacionada con la caracterización morfológica de la lesión en el modelo de AQ, la segunda estuvo encaminada a la obtención, aislamiento y caracterización inmunocitoquímica de las CMO así como a la determinación de la concentración óptima de estas células para el trasplante en el modelo de AQ. En la tercera fase se realizó el trasplante de CMO y,

previo a este y después de este se hizo una evaluación de la conducta del animal. Finalmente se realizó una evaluación morfológica del trasplante.

#### Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos adultas de la línea SpragueDawley (SD), con pesos entre 200-250 gr al comienzo del experimento, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de humedad ( $67 \pm 3\%$ ) y a una temperatura media de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), con suministro de alimentos y agua ad libitum y períodos de luz y oscuridad de 12 horas. Las ratas fueron mantenidas en grupos de 5 por caja, al inicio del experimento, y una vez que los animales fueron trasplantados se mantuvieron 3 por caja.

#### Criterios de exclusión

Fueron excluidas del estudio aquellas ratas pertenecientes a cualquiera de los grupos experimentales que mostraron en algún momento infecciones severas, lesiones en los ojos que les dificultaran la visión y atrofia marcada de alguna extremidad.

#### Modelo animal de EH por inyección intraestriatal de AQ

##### • Dosis de ácido quinolínico de 1,4 $\mu\text{L}$

Los animales fueron distribuidos en tres grupos experimentales:

No.	Grupos experimentales	N
1	Ratas lesionadas con AQ	10
2	Ratas falsas lesionadas	4
3	Ratas sanas	4

Con el fin de provocar la muerte neuronal de las células del cuerpo estriado (hemisferio derecho) las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral 7% (420 mg/Kg) y colocadas en un aparato de cirugía estereotáctica para roedores (David Kopf Instruments). Se localizaron las siguientes coordenadas (mm) correspondientes al estriado derecho según el Atlas de Paxinos y Watson (Paxinos, 1986) AP=+1.2 por delante de Bregma, L=+2,8 y DV=-5,5. Localización de la barra incisiva a 2 mm por debajo de la línea interaural.

Se inyectaron 1,4  $\mu$ l de una solución de AQ a una concentración de 112,5 nM, la cual se preparó de la siguiente manera:

1. Se pesaron en una balanza analítica 370 mg de AQ.
2. Se disolvió con 1 mL de NaOH 0,1 M + 1 mL de NaCl 0,9%.
3. Se adicionó 10 mL de NaCl 0,9%.
4. Se ajustó el pH a 7.4 añadiendo HCL 1 M.
5. Y, finalmente, fue completado a un volumen de 20 ml con NaCl 0,9%.

Una vez en el lugar, la neurotoxina se inyectó lentamente a una velocidad de flujo de 1mL/min, utilizando una jeringuilla Hamilton (10  $\mu$ L), la cual se mantuvo in situ 5 minutos después de finalizada la inyección, para evitar el reflujo de la neurotoxina.

#### • Dosis de ácido quinolínico de 1,2 $\mu$ L

El procedimiento quirúrgico utilizado fue igual al descrito anteriormente, con la diferencia de que se inyectaron 1,2  $\mu$ L de la solución de AQ.

El grupo de ratas falsas lesionadas fue obtenido de igual manera que el de ratas lesionadas con AQ, con la diferencia de que en vez de inyectar AQ, en su lugar se utilizó solución salina fisiológica (SSF).

#### ***Evaluación morfológica de la lesión***

Transcurridos 30 días de la lesión, todos los animales lesionados, 4 animales falsos lesionados y 4 animales sanos, fueron anestesiados con hidrato de cloral (420 mg/Kg, i.p) y sacrificados para la realización del estudio morfológico. La fijación de las muestras se llevó a cabo por el método de perfusión aórtica; se pasaron por cada rata 250 mL de solución salina y luego 300 mL de solución fijadora (paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino [PBS] al 0,1 mol/L, pH 7,3). Los cerebros fueron extraídos y posfijados en la misma solución fijadora durante 3h. Posteriormente las muestras se deshidrataron en soluciones de sacarosa al 7, 15 y 30% durante 12 h en cada caso y seguidamente fueron congeladas y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron cortes coronales a un grosor de 20 mm, en un criostato digital 1720 (Leitz, Alemania). Se recogieron 2 series de 20 cortes, cada una representativa de la lesión y del núcleo estriado, mediante un muestreo sistemático y al azar, en láminas gelatinizadas y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior

uso. Para determinar la pérdida neuronal estriatal fue coloreada una serie de secciones con *cresil violeta* al 0,5% y la otra serie se destinó a la determinación de la actividad astrocítica por el método inmunohistoquímico.

**Inmunohistoquímica:** Las muestras fueron descongeladas y lavadas (PBS 0.1M). Posteriormente se incubaron en una solución de bloqueo durante 20 min (PB 0,1 M, suero fetal de ternera al 20% y tritón al 0.25%). El anticuerpo primario policlonal anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial, del inglés Glial Fibrillar AcidProtein) (1/1000, Dako), el anticuerpo secundario biotinilado anti-Ig de conejo (1/500, Dako), y el complejo ABC peroxidasa (1/100, DAKO), fueron diluidos con PBS que contenía suero fetal de ternera al 1%, y 0.125% de tritón (X-100). Para el anticuerpo primario la incubación se realizó durante toda la noche y para el anticuerpo secundario y el complejo ABC peroxidasa, durante una hora. Posterior a cada una de estas incubaciones se efectuaron 3 lavados en PBS de 5 mn cada uno. Para el revelado se utilizó 3,3 diaminobenzidina al 0.05% y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.01%. Seguidamente las secciones fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, aclaradas en xilol y montadas con la solución de montaje DPX. La observación de las muestras se realizó en un microscopio de campo brillante.

#### ***CMO de rata para el trasplante en el modelo de lesión por AQ***

Las células fueron obtenidas de fémur de ratas machos SD, con peso entre 250 y 300 g. Todo el material utilizado 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 la técnica inmunocitoquímica empleada para la caracterización de las mismas:

#### • Obtención de las CMO

Las CMO fueron aisladas a partir de fémures de rata según se describe en el trabajo de (Woodbry y Col, 2000). Ratas SD machos fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con hidrato de cloral al 7% (0,6 mg/Kg de peso). Se les 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 fue colocado el hueso extraído en una placa de Petri que contenía 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 infundió PBS

en una sola dirección utilizando una jeringuilla de 10 mL, la suspensión obtenida, rica en CMO, fue recogida en tubos estériles para su posterior lavado por centrifugación.

#### • **Aislamiento de las CMO**

Para el aislamiento celular se siguieron las normas establecidas en el PNO 605.5.22 del laboratorio de Inmunología, como brevemente se explica:

El tubo que contenía las CMO en suspensión, fue lavado con PBS 3 veces (en una proporción volumen a volumen), durante 10 minutos a 540 g (20 °C). Después de cada lavado se desechó el sobrenadante y se mezclaron nuevamente las células con PBS.

Se colocaron en un tubo de cristal 2,5 mL de ficoll-Paque™ Plus (Amershan AB Sweden), y seguidamente se depositaron 5 mL de la suspensión de CMO de forma cuidadosa, dejándola caer por las paredes del tubo evitando que se uniera el ficoll con la mezcla de PBS-células.

Los tubos se centrifugaron durante 45 minutos a 2100 g, a una temperatura de 20 °C. Finalizada la centrifugación se extrajo la capa de células mononucleadas, succionando el anillo celular con una pipeta pasteur.

Las células fueron lavadas 3 veces con PBS durante 10 minutos a 1100 g, a una temperatura de 20 °C. Finalizados los lavados por centrifugación desechamos el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito al 7% y el sedimento celular fue resuspendido en medio de cultivo (DMEM + Suero Fetal Bovino [SFB] al 10% + Glutamina 2 mM).

#### • **Marcaje de las CMO**

A la suspensión de células obtenidas por el método anteriormente descrito y 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), para obtener una concentración final en el medio de 1mg/mL. Seguidamente las células fueron incubadas durante 12 h en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> /aire saturada de humedad. 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 a 420 nm. El conteo del número de células se realizó en cámara de Neubauer, utilizando como colorante vital azul de tripán, 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 CMO**

Para la caracterización de las CMO se utilizó una técnica inmunocitoquímica que siguió las normas establecidas en el PNO605.5.24 del laboratorio de Inmunología, como brevemente se explica:

Utilizamos un formato en el cual las láminas de 12 pocillos fueron recubiertas con las células mononucleares, a las cuales se les unirá el anticuerpo monoclonal específico contra una de las proteínas en estudio CD34 (1/40, DAKO), CD38 (1/200, DAKO), CD45 (1/50, DAKO) y CD90 (1/20, DAKO). Después del lavado, la cantidad de anticuerpo monoclonal unido específicamente se detectó usando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado (1/700, DAKO) con biotina, que actuó como anticuerpo secundario. El complejo ABC/Fosfatasa Alcalina (1/100, DAKO) se diluyó en PBS que contenía suero fetal de ternera al 1% y 0,125 de tritón X-100. Para el anticuerpo primario la incubación fue durante toda la noche a 4 °C y para el anticuerpo secundario y el complejo ABC se corrieron los tiempos de incubación de 50 y 45 minutos, a temperatura ambiente respectivamente. Para el revelado se utilizó el 4-cloro 2-metilbencenodiazonio (fas red) 1 mg y naftol 1 mL. Este procedimiento permitió la entrada de la avidina, amplificando la respuesta del sistema cuando se le añadió el sustrato cromogénico. La lectura se realizó en un microscopio de luz.

#### **Establecimiento de la concentración celular**

Este experimento estuvo dirigido a evaluar cuál de las concentraciones de CMO trasplantadas (tabla 3), lograba una mejor sobrevivencia e integración en el tejido hospedero.

#### • **Grupos experimentales**

Se crearon tres grupos experimentales que fueron lesionados en el estriado con AQ (1,2 mL) y trasplantados con tres concentraciones diferentes de la suspensión celular según el grupo experimental, ver tabla siguiente:

#### • **Procedimiento experimental**

1. Se trasplantaron por cirugía estereotáctica las CMO marcadas con bisbenzimidida, en el estriado derecho de ratas lesionadas con AQ (1,2 mL).

Grupo experimental	n	Concentración celular por depósitos (cel/ $\mu$ L)	Número de depósito	Volumen por depósito ( $\mu$ L)	Número total de células trasplantadas
Grupo I	8	150 000	2	1	300 000
Grupo II	3	100 000	2	1	200 000
Grupo III	7	50 000	2	1	100 000

Cantidad de células utilizadas (cel/ $\mu$ L), en la estandarización de la concentración de CMO. Se usaron 2 depósitos con un volumen en cada uno de ellos de 1  $\mu$ L.

- La coordenada de trasplante utilizada fue: AP= +1.2 mm, L=+2.8 mm, V<sub>1</sub>= -5.5 mm, V<sub>2</sub>= -4.6 mm.
- Se colocaron 2  $\mu$ l como volumen final de las suspensiones celulares. La concentración final por depósito para cada caso se indica en la tabla No. 3 según el grupo experimental.

• **Parámetros para seleccionar la concentración de CMO a trasplantar**

- Sobrevivencia de las células trasplantadas.
- Migración de las células: Se evaluó la extensión antero-posterior del trasplante, así como la localización anatómica del mismo.

• **Estudio morfológico**

Se realizó la evaluación morfológica cualitativa del trasplante, 30 días después del mismo. El sacrificio de los animales, la extracción del cerebro, el procesamiento, la conservación y el corte fueron realizados como se describe anteriormente. Para el análisis de las células mononucleares de la médula ósea, los cortes histológicos fueron observados al Microscopio Óptico/fluorescencia a una longitud de onda de 330-380 nm (filtro ultravioleta).

**Evaluación funcional del trasplante de CMO**

Se trabajó con la concentración celular ajustada (50 000 cel/ml, en 2 depósitos diferentes, o sea 100 000 células totales), en el estriado lesionado con AQ (1,2  $\mu$ l).

En todos los grupos experimentales se realizó la prueba una semana después de la inyección con AQ y 2 meses después del trasplante de CMO.

- **Grupos experimentales:** Se utilizaron animales SD machos adultos con peso corporal entre 200 a 250 g.

Grupo	Designación del grupo experimental	N
I	Ratas sanas	10
II	Ratas con lesión de AQ solamente	10
III	Ratas con lesión de AQ y trasplantadas con CMO	10
IV	Ratas con lesión de AQ y trasplantadas con DMEM	10

Muestra los grupos experimentales utilizados para evaluar la conducta motora en los animales de experimentación. DMEM: (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

El DMEM es un medio artificial formulado para el mantenimiento *in vitro* de células de mamíferos.

• **Pruebas conductuales:**

**Prueba conductual 1.** Conducta de Giro inducida por D-anfetamina (Ungerstedt, 1970).

Este experimento estuvo dirigido a evaluar la conducta motora del animal a través de la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina.

Se inyectó a cada sujeto experimental 5 mg/Kg de peso de D-anfetamina intraperitoneal (i.p.), una semana después de la inyección con AQ fue analizada en todas las ratas la Conducta de Giro inducida por esta droga, tomando el número de vueltas completas (360°) que dieron los animales cinco minutos después de la inyección con D-anfetamina, las cuales se registraron en un rotómetro electrónico que cuantifica automáticamente los giros que realiza el animal hacia la derecha y/o izquierda (multicontador LE 3806 acoplado a sensores LE 902 panlab, España).

**Prueba conductual 2.** Habilidades motoras de las extremidades anteriores (Montoya, 1991).

Este experimento estuvo dirigido a evaluar la conducta motora del sujeto experimental a través de la habilidad

que muestra el animal al utilizar sus extremidades anteriores para capturar el alimento en una caja de restricción.

### **Caja experimental:**

En la evaluación de las habilidades motoras en los animales de experimentación, se emplearon cajas de acrílico transparentes (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 estaban ocupados por una plataforma central de 4.7 cm de alto y 2,9 cm de ancho, con espacios en ambos lados para insertar una escalerilla móvil de seis escalones en cada uno de los extremos. Cada escalón y nivel inferior (piso de la caja) tenían una pequeña concavidad donde se situaron dos trozos de alimento (pellets) con sabor diferente al que normalmente ingieren, por lo cual los animales disponían de catorce pellets a cada lado. La plataforma central impedía que cada animal alcanzara el alimento de un lado con la extremidad contraria. La base del extremo posterior de la caja fue eliminada para posibilitar el acceso de la rata al compartimiento interior.

Seis días antes de la realización de la prueba las ratas fueron sometidas a un régimen restringido de alimentación (10-12 g de alimento diario por animal). Tres días después de comenzado este, los animales se colocaron dentro de las cajas experimentales una vez por día durante 15 minutos, con el propósito de que se familiarizaran con la prueba y las condiciones experimentales.

Una vez comenzadas las sesiones experimentales las ratas se introdujeron en las cajas de prueba, una vez al día durante 15 minutos por 6 días consecutivos. Al final de cada sesión se retiraron las escaleras de las cajas experimentales y se contabilizaron los trozos de alimentos que no fueron comidos, de cada lado (derecho e izquierdo), de manera independiente.

### **Procesamiento estadístico**

Fue analizada la distribución y la homogeneidad de varianza de la variable Conducta de Giro inducida por D-anfetamina, número de trozos de alimentos, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene, respectivamente. Una vez comprobada la no distribución normal de la muestra los datos fueron analizados con pruebas no paramétricas.

Con el propósito de conocer de manera general el comportamiento de los grupos, en las diferentes pruebas conductuales desarrolladas se realizó una estadística descriptiva y se procesó toda la información recogida

mediante el software profesional Statistica para Windows. Versión 6.0, Copyright Statsoft, Inc. 1993.

Para conocer la efectividad del trasplante se llevó a cabo la comparación de los resultados de la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina, de la "Prueba de Habilidades Manuales de las extremidades anteriores" antes y después del trasplante mediante la aplicación de la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. Para el estudio comparativo de la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina, entre los grupos experimentales, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba U de Mann-Whitney. La comparación de los resultados de la "Prueba de Habilidades Manuales de las extremidades anteriores" se hizo siguiendo el mismo esquema descrito para la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina.

## **Resultados**

### ***Modelo animal de EH por inyección intraestriatal de AQ y evaluación morfológica de la lesión***

#### **• Dosis de ácido quinolínico de 1,4 µL**

La inyección con AQ en el estriado derecho provocó la pérdida parcial de neuronas estriatales y abundante gliosis (hipertrofia e hiperplasia de microglías y astrocitos) que se acompañó de una dilatación del ventrículo lateral, característica que se diferencia de lo observado en el estriado contralateral sano (figura 1A). La coloración de cresil violeta empleada tiñe los cuerpos de Nissl presentes en el soma y las dendritas neuronales, así como el núcleo de las células gliales (figura 1 B, C). La detección inmunohistoquímica de la GFAP demostró la gliosis astrocítica. La observación en campo claro y microscopia de fluorescencia muestra en algunos casos la pérdida de la imagen en parches característica del estriado (figura 1 D, E).

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 la dosis de 1,4 µL de AQ la lesión se extendió 3,6 mm en sentido anteroposterior y no solo se ubicó en los núcleos caudado putamen, sino que se extendió a áreas adyacentes tanto de tipo GABAérgico, como no GABAérgico. Las áreas extraestriatales mayormente afectadas fueron: corteza frontal parietal

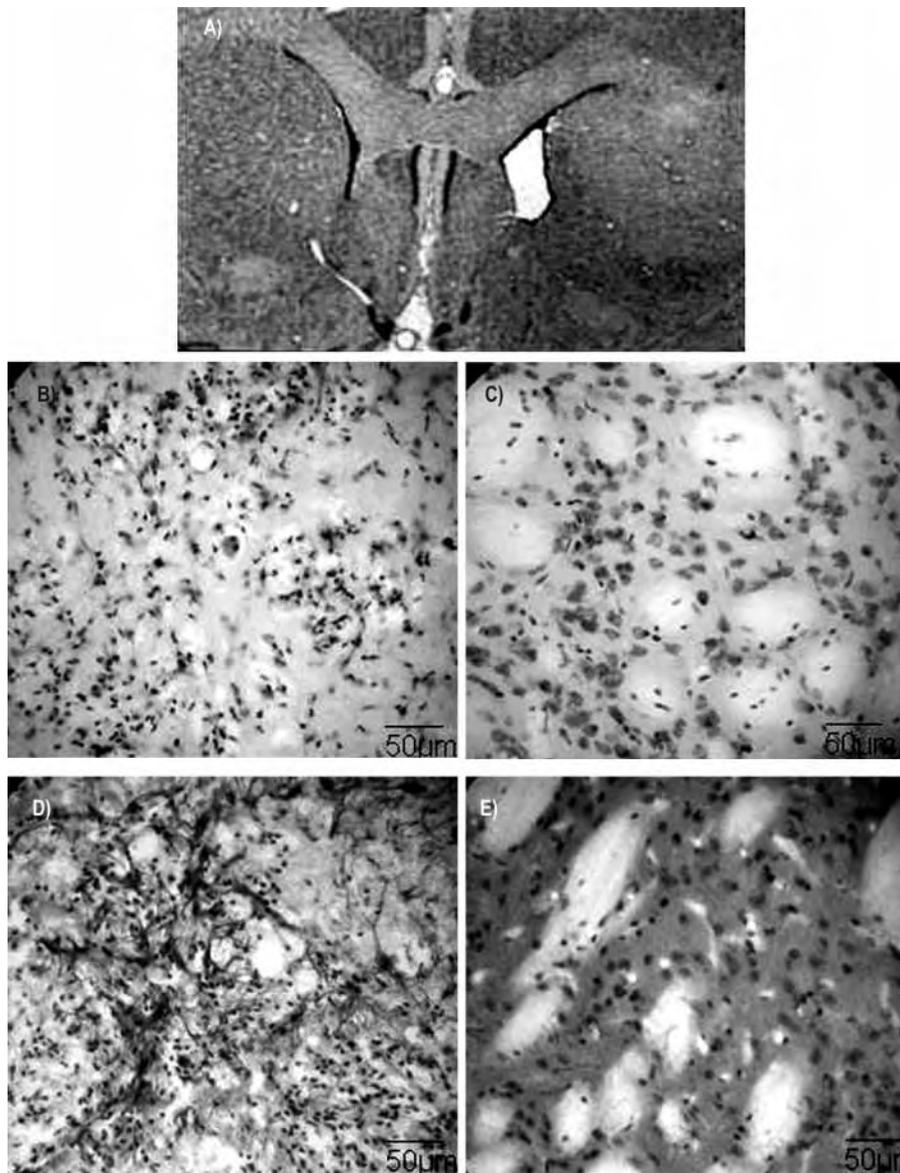
motora, claustrum, núcleo endopiriforme, globos pálido, pálido ventral y áreas talámicas.

• **Dosis de ácido quinolínico de 1,2  $\mu$ L**

La reducción de la dosis de AQ empleada a 1,2  $\mu$ L se realizó con el objetivo de reducir el daño extraestriatal. Las características de la lesión para la dosis de 1,2  $\mu$ L de AQ se corresponden en general con las descritas en la primera etapa para 1,4  $\mu$ L de AQ, 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 extraestria-

tales, dañándose en algunos casos claustrum, núcleo endopiriforme, globos pálido, no así pálido ventral y las áreas talámicas.

Finalmente se seleccionó la dosis de 1,2  $\mu$ L de AQ para lesionar el estriado, teniendo en cuenta la afectación de las áreas extraestriatales. Se comprobó que con este volumen de AQ se induce una lesión en el núcleo estriado, similar a la producida con el volumen de 1,4  $\mu$ L de AQ, pero a diferencia de lo que ocurre con este volumen, encontramos que con la dosis más baja existe una menor afectación de los tejidos vecinos.



**Figura 1.** A). Corte coronal de estriado sano y lesionado (derecha), 200x. Estriado normal y lesionado donde se demuestra la pérdida neuronal, el aumento de la gliosis y la pérdida de la imagen definida en parches de esta estructura al compararse con el lado estriatal sano, coloración de cresil violeta (B y C). Demostración del aumento de la gliosisastrocítica (GFAP) con respecto al lado sano (D y E).

## CMO de rata para el trasplante en el modelo de lesión por AQ

### Obtención, aislamiento, marcaje y caracterización inmunofenotípica de las CMO

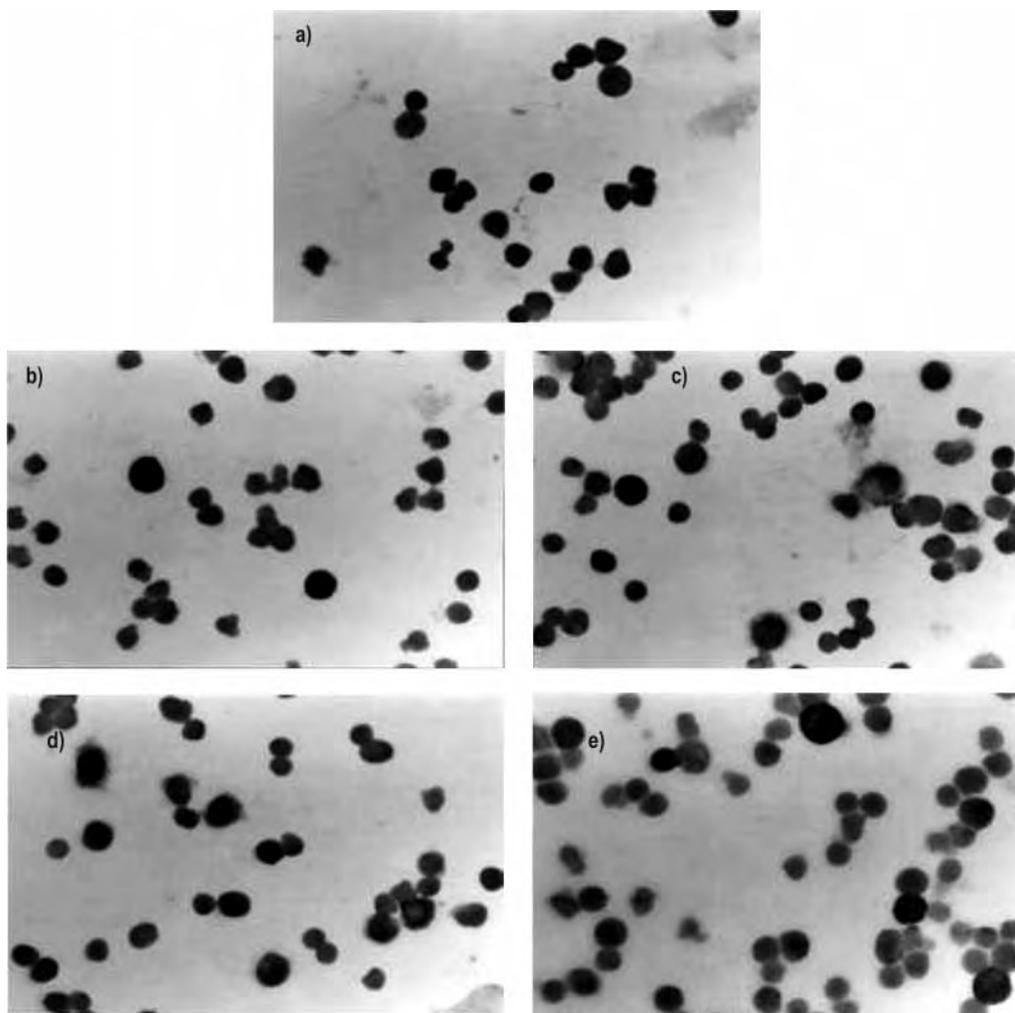
Las CMO fueron obtenidas, aisladas y marcadas como se describió previamente, además se realizó la caracterización de estas células desde el punto de vista inmunofenotípico, lo que permitió conocer la composición de la suspensión celular que sería utilizada para el trasplante. En la Figura No. 2 se muestra el estudio inmunocitoquímico, el cual permitió detectar, de manera específica en las CMO, las proteínas de superficie celular. Durante su caracterización estas células fueron positivas para los marcadores (CD34+; CD38+;

CD45+ y CD90+). Para cada caso se utilizó el correspondiente control negativo (figura 2 a, b, c, d y e).

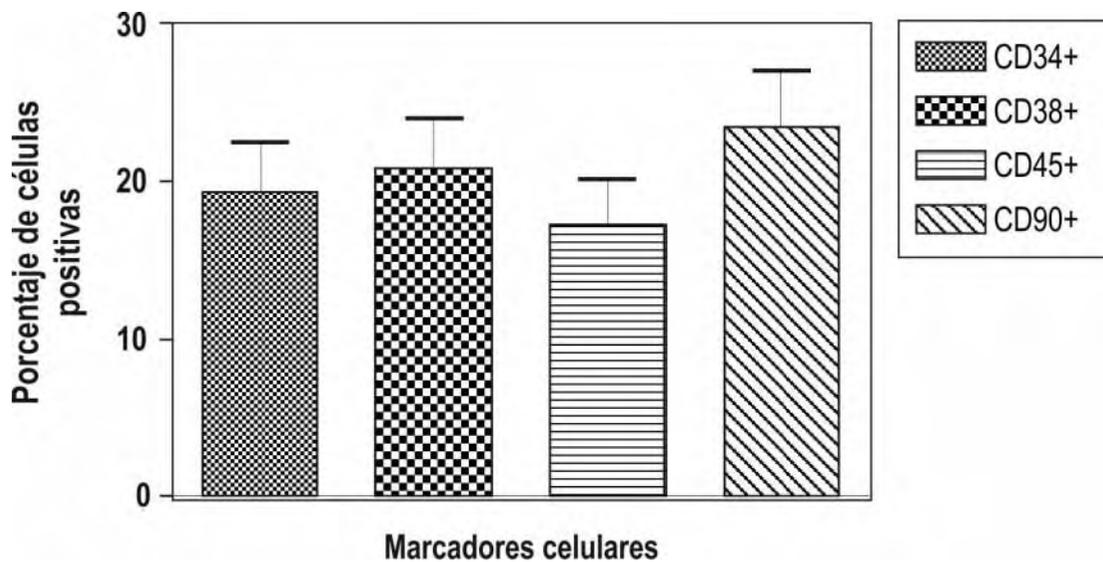
La figura 3 muestra la media del porcentaje de células positivas para cada uno de los antígenos de superficie celular, indicando la contribución que aporta cada marcador al porcentaje general dentro de la caracterización realizada: CD34 = 19,33%, CD38= 20,80%, CD45 = 17,27%, y CD90 = 23,52%. Estos resultados muestran la heterogeneidad de los marcadores estudiados.

### Establecimiento de la concentración celular

Para el establecimiento de la concentración celular de las CMO que debían ser trasplantadas se realizaron tres grupos experimentales, cada uno a diferentes con-



**Figura 2.** Células mononucleadas de médula ósea caracterizadas para el trasplante en el modelo de lesión por inyección de ácido quinolínico: a) Control negativo, b) CD34; (1:40, DAKO), c) CD38; (1:200, DAKO), d) CD45; (1:50, DAKO) y e) CD90; (1:20, DAKO).



**Figura 3.** Media  $\pm$  la desviación estándar del porciento de células positivas para los marcadores CD34, CD38, CD45 y CD90.

centraciones como se describió en materiales y métodos. Los animales fueron lesionados en el estriado con AQ (1.2  $\mu$ l) y trasplantados con CMO, marcadas con bisbenzimidida, a la concentración indicada según el grupo experimental.

#### • Estudio morfológico

Se constató en cada animal la lesión estriatal por AQ. La observación al microscopio óptico de fluorescencia demostró supervivencia de las células trasplantadas, las cuales mostraron un núcleo azul fluorescente. En general, las células trasplantadas 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. No fue característica la disposición de las células trasplantadas en halo que supusiera la muerte de las células centrales. Se observó, además, una distribución de las células marcadas en el tejido estriatal circundante.

Para las concentraciones de 200 000 y 300 000 células totales se apreció una abundante respuesta inflamatoria, por la presencia de células macrofágicas del sistema inmune que mostraban autofluorescencia de color amarillo-verdoso.

Grupo I (300 000 células totales): Se observaron un total de 8 cerebros, en cinco de ellos pudo verse supervivencia de las células trasplantadas, en los tres cerebros restantes no se observaron células marcadas de color azul. Sin embargo, la supervivencia para esta concentración puede evaluarse, desde el punto de vista cua-

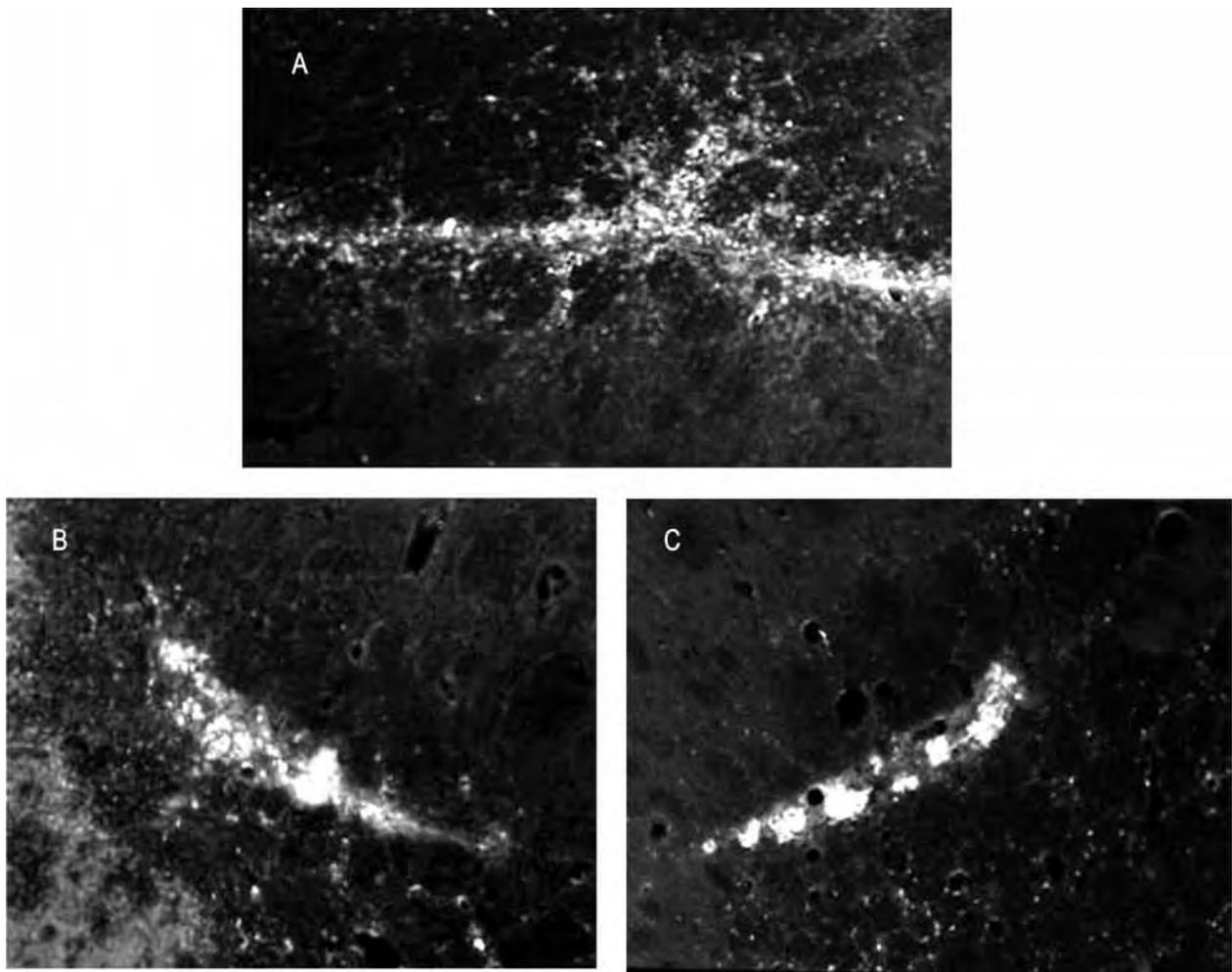
litativo, como muy pobre, además existió muy poca definición de célula a célula, las cuales en ocasiones formaban agregados celulares o "motas". Asociadas al área del trasplante se hallaron abundantes células macrofágicas de la respuesta inmune. Figura 4A.

Grupo II (200 000 células totales): Se analizaron un total de 3 cerebros. En todos los casos se observó una baja supervivencia de las células trasplantadas, acompañadas por células macrofágicas dispuestas como un cordón a lo largo del área de trasplante. Figura 4B.

#### Grupo III (100 000 células totales)

En los 7 cerebros analizados se pudo apreciar una alta supervivencia de las células trasplantadas. En el área del trasplante, definida en torno al trazo de inyección, se pudieron apreciar claramente los dos depósitos celulares. Además se pudo comprobar que para esta concentración se favoreció la migración de las células hacia el tejido hospedero estriatal circundante. 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. Se observaron claramente los dos depósitos de inyección. Para esta concentración se pudo evaluar la supervivencia, desde el punto de vista cualitativo, como muy buena. Figura 4C

En la figura 4 se muestra una fotografía de las concentraciones celulares utilizadas para el trasplante del estriado lesionado con AQ.



**Figura 4.** Trasplante de CMO en el estriado lesionado con AQ. A) Trasplante con una concentración total de células de 300 000 cél/  $\mu$ l. B) Trasplante con una concentración total de células de 200 000 cél/  $\mu$ l. C) Trasplante con una concentración total de células de 100 000 cél/  $\mu$ l. De manera comparativa se puede apreciar que en C hay una mejor distribución de las células trasplantadas.

### ***Evaluación funcional del trasplante de CMO a través de la conducta motora***

#### **Prueba conductual 1 pre y postrasplante de CMO:**

#### ***Conducta de Giro inducida por D-anfetamina***

La Conducta de Giro inducida por D-anfetamina (5 mg/Kg intraperitoneal) se evaluó una semana después de la inyección intracerebral de AQ en todos los grupos experimentales, incluidos el grupo de controles sanos y un mes después de realizado el trasplante de CMO. La gráfica representada en la figura No. 5 muestra la conducta rotatoria antes y después del trasplante de CMO, donde se puede constatar que un mes

después del trasplante de CMO (n= 10), las ratas trasplantadas mostraron una disminución significativa ( $p < 0.005$ , prueba de Wilcoxon para muestras pareadas) en la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina. Un hallazgo interesante para el grupo de lesión con AQ solamente, fue la disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,0093$ ), encontrada un mes después de la lesión con AQ (sin tratamiento con CMO) cuando se comparó con la prueba inicial que se realizó una semana después de la lesión con AQ.

De manera general la Conducta de Giro con D-anfetamina en el estudio pre-trasplante se manifestó de acuerdo con lo esperado, donde los grupos lesionados con AQ se diferenciaron del control sano; de igual manera, en la comparación entre los grupos

pos-trasplante se observaron diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) en la Conducta de Giro entre el grupo de animales trasplantados con CMO, los lesionados con AQ y los que recibieron un falso trasplante, mostrando el grupo de trasplante un comportamiento similar al control sano.

### ***Prueba conductual 2 pre y pos-trasplante de CMO:***

#### **Prueba de las habilidades motoras de las extremidades anteriores**

A la tercera semana después de la lesión con AQ y a la sexta semana después del trasplante de CMO y/o DMEN fueron evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores, mediante la aplicación de la "Prueba de Habilidad Manual". Los resultados obtenidos tanto para la extremidad derecha como izquierda pre y pos- trasplante se muestran en las figuras No. 6 y No. 7 donde se puede evidenciar que los grupos lesionados con AQ (grupo LAQ solamente; LAQ + TpCMO; LAQ + DMEN) dejaron un mayor número de pellet que los animales del grupo sano ( $p < 0,0007$ ). Además se demostró para ambas extremidades, una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,0007$ ) en el número de pellet dejados por el grupo LAQ + TpCMO para ambas extremidades después del trasplante con CMO.

### **Discusión**

#### ***Modelo animal de EH por inyección intraestriatal de AQ.***

La infusión intracerebral de AQ produce cambios morfológicos y bioquímicos en los animales de experimentación que semejan 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 ha planteado la hipótesis de que esta excitotoxina interviene en su patogenia. La lesión tisular producida por el AQ constituye el mejor modelo de excitotoxicidad que se conoce hasta ahora, lo que ha sido atribuido al tipo de daño neuronal que produce, donde hay una lesión selectiva de neuronas de talla media, con una pérdida significativa de GABA y de sustancia P, unido a una pérdida relativa de las concentraciones de somatostatina y neuropéptido (Beal, 1986).

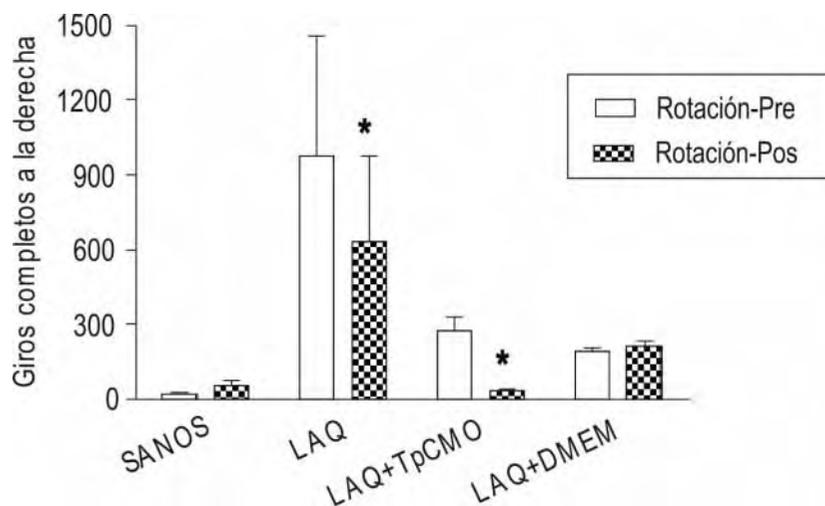
En este trabajo se utilizaron dos dosis diferentes de AQ para lesionar el estriado (1,4  $\mu$ L y 1,2  $\mu$ L). Con ambas dosis se obtuvieron pérdidas neuronales que abarcaron, aunque no en su totalidad, una gran parte de esta estructura. Esto permitió reproducir el modelo

de AQ, que ya había sido establecido hace varias décadas (Schwarcz, 1983). Se demostró que la lesión estriatal con AQ induce una marcada muerte neuronal en el estriado, acompañada por una gliosis de grado variable en dependencia de la dosis de AQ utilizada, que pudo ser evidenciada por la alta reactividad en la expresión de GFAP (fig. 1 D y E). En los animales lesionados con AQ, esta marcada gliosis aparece no solo en el estriado, sino también en otras áreas. Además, con las dosis utilizadas, las estructuras dañadas fuera del estriado, reportadas en este trabajo, fueron muy similares a las que se reportan en la literatura, relacionadas a la amígdala, septum, hipotálamo, globo pálido, entre otras (Beal, 1986). Este hecho también ha sido obtenido por otros autores (Francis, verificar, en la bibliografía aparece T y no L) 2000), quienes describen, además, hipertrofia e hiperplasia de las microglías y los astrocitos, unido a la pérdida neuronal (Beal, 1991).

Las dos dosis se trabajaron a una concentración de 112,5 nM, lo que se encuentra en el rango reportado en la literatura (Pérez-De La Cruz, 2009, Curry, 2004, Hanbury, 2003). Para la última etapa del presente estudio, fue seleccionada la dosis de 1,2  $\mu$ L. Se escogió esta última dosis teniendo en cuenta la afectación de las áreas extraestriales, ya que se comprobó que con este volumen de AQ se induce una lesión en el núcleo estriado, similar en amplitud a la observada con el volumen de 1,4  $\mu$ L, pero con una menor afectación de los tejidos vecinos. Una explicación plausible a la decisión de no reducir más el volumen de AQ, estuvo basada en que una disminución mayor de la cantidad de esta neurotoxina, implicaría una mayor reducción del área estriatal lesionada; es decir, que la pérdida celular no podría ser evidenciada a través de cambios morfológicos manifiestos, lo que entorpecería la obtención adecuada de nuestro modelo. La pérdida neuronal y la gliosis astrocítica, reportada en el estudio, concuerdan con lo obtenido por otros autores, evidenciándose que inmediatamente que las neuronas mueren, aparecen mecanismos por medio de los cuales se trata de reparar el daño. Por tanto, se puede deducir que la dosis de 1,2 mL de AQ es apropiada para la lesión del núcleo estriado, independientemente de que no queda lesionado en su totalidad y que se mantienen algunas afectaciones extraestriales. Esta dosis brinda el sustrato morfológico adecuado para la obtención del modelo, que pudo ser evidenciado a través de los estudios conductuales.

#### ***Empleo de las CMO de rata para el trasplante***

Las CMO son una fuente importante de células que pueden ser utilizadas con un alto grado de confiabi-



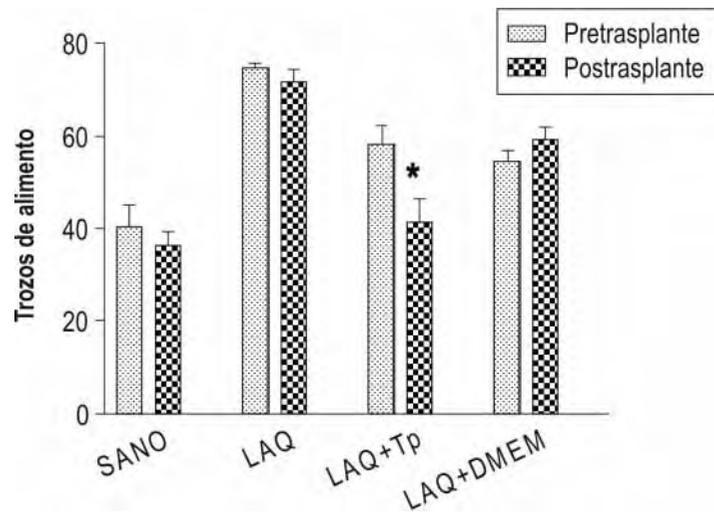
**Figura 5.** Conducta de Giro inducida por D-Anfetamina antes y después del trasplante de CMO en los grupos controles, lesionados con AQ y trasplantados con CMO. Abscisas: número de vueltas completas (360o) ipsilateral al hemisferio lesionado (media  $\pm$  EEM); ordenadas: Grupos experimentales. Asimetría significativa ( $p < 0,005$ ).

lidad para el trasplante celular en aquellas enfermedades donde se ha demostrado que pueden jugar un papel fundamental en la generación del tejido dañado. Estas células constituyen una fuente alternativa para ser empleadas en el trasplante de pacientes con enfermedades neurológicas. En nuestro estudio las CMO fueron obtenidas, aisladas y marcadas con bisbenzimidida, sin presentar ningún riesgo, y utilizando métodos sencillos, lo cual indica que existe una forma de acceder a ellas relativamente fácil y libre de censuras éticas. Para comenzar, se partió de una muestra obtenida directamente del fémur de las patas traseras de la rata, la cual contenía una mezcla de células, que posterior al aislamiento fueron separadas y permitió circunscribirnos a las células mononucleares, hecho que demuestra la heterogeneidad de la composición de la suspensión celular, pues ya se conoce que en ella existen células de diferentes linajes. El aislamiento de las CMO fue realizado utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque (Colter, 2001), que permitió la obtención de las células deseadas con un alto rendimiento y buena viabilidad. De manera general se puede asegurar que en el estudio realizado se monitoreó este proceso bajo condiciones estrictas de esterilidad, lo que garantizó una muestra pura para obtener resultados más confiables.

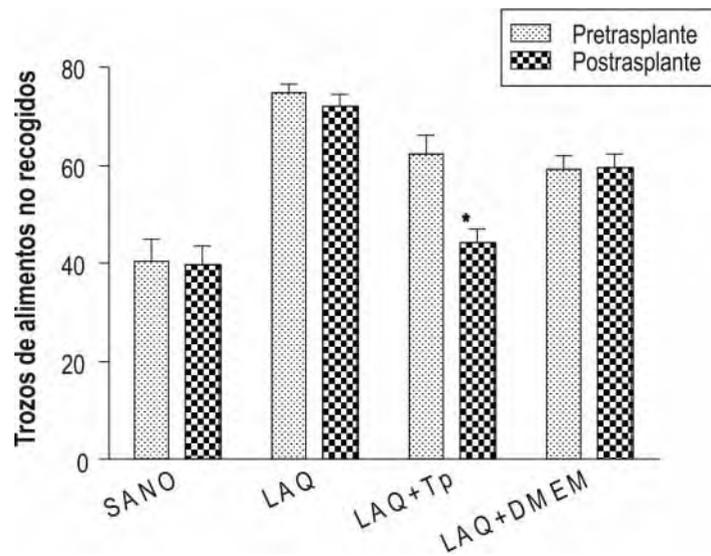
Existen marcadores de superficie que indican el tipo de célula específica que forma parte de la población de las CMO. Habitualmente se ha empleado marcadores de superficie celular para la identificación de estas células en etapas tempranas, pero estudios más amplios han mostrado que el inmunofenotipo de ellas es mucho

más complejo. Estas células pueden expresar un espectro de marcadores más extenso que está sujeto al estado de diferenciación celular, donde los antígenos de superficie aparecen y desaparecen en un período determinado del desarrollo evolutivo (Prosper, 2003; Weissman, 2001 (verificar orden cronológico)). Los resultados expresaron los porcentos de células positivas para los marcadores CD34, CD38, CD45 y CD90 (figura 3), demostrándose que los mismos se encuentran en el rango de lo reportado por otros autores. El hecho de que no todas ellas hayan sido portadoras del mismo marcador, indica la existencia de líneas celulares diferentes, que están formando parte de la muestra en estudio. En este caso, la heterogeneidad celular explicaría el hallazgo encontrado, que no difiere con lo reportado por otros autores.

Durante varios años se consideró que la célula madre hematopoyética era la única CMO, con capacidad regenerativa, sin embargo hoy se sabe que la composición de la médula ósea es más compleja, ya que se ha identificado un grupo heterogéneo de células madre adultas que incluyen además de las hematopoyéticas y mesenquimales, la denominada población lateral (Jiang, 2002) y las células progenitoras adultas multipotentes (Zanjani, 1999). El estudio realizado 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



**Figura 6.** Evaluación de las habilidades motoras de la extremidad anterior derecha antes y después del trasplante de CMO en cada grupo experimental. Se muestra el valor promedio total del número de trozos de alimentos dejados en el lado derecho de la escalera por cada grupo. Nótese la diferencia significativa ( $p < 0,0007$ ) que aparece en el grupo de trasplante de CMO (LAQ + Tp).



**Figura 7.** Evaluación de las habilidades motoras de la extremidad anterior izquierda antes y después del trasplante de CMO en cada grupo experimental. Se muestra el valor promedio total del número de trozos de alimentos dejados en el lado izquierdo de la escalera por cada grupo. Nótese la diferencia significativa ( $p < 0,0007$ ) que aparece en el grupo de trasplante de CMO (LAQ + Tp).

que se calculó sobre la base de una suspensión celular en la cual había una mezcla de todas estas poblaciones celulares. Lo que puede indicar que al por ciento general de cada marcador esté contribuyendo al aporte individual suministrado por cada una de las subpoblaciones celulares que porte el marcador correspondiente. Además, la posibilidad de que no todas las células hayan sido positivas para un marcador, pudiera significar que hay células en diferentes estadios de diferenciación, o que este grupo de células corresponda 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, y que no fueron identificadas en este estudio, ya que no se utilizaron marcadores específicos para ellas. Además de estos aspectos se puede pensar en que el por ciento de positividad a un marcador dado esté representando la unión de más de un tipo celular, pues se conoce que varias de estas células son portadoras de un mismo marcador de superficie que las identifica.

En general, muchas son las moléculas que pueden ser utilizadas para la caracterización de las diferentes poblaciones celulares que forman parte de los elementos formes 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 (Verfaillie, 2002; Langman, 1997). Por otra parte, dentro de la subpoblación de células mesenquimales que forman parte del repertorio de las CMO, se ha identificado otro antígeno de superficie válido para su caracterización, el CD90 (Prosper, 2003; Haynesworth, 1992). Este antígeno fue detectado de manera satisfactoria en las células del presente estudio, aportando también como el resto de los antígenos un porcentaje en la identificación de las mismas. Formando parte de la población lateral se ha detectado subpoblaciones CD34 + y CD34 - (Garrido, 2003), y de las células ovoides el CD34+, entre otros (Theise, 2000). Un aspecto que se debe destacar y que conforma el elemento básico del presente estudio, es que los porcentajes hallados de células positivas para los marcadores de superficie celular se encuentran dentro de los valores que han sido descritos en la literatura (Haynesworth, 1992; Weissman, 2001). De manera general las células madre tienen una frecuencia media en la médula ósea muy baja, por lo que esto explica los bajos porcentajes de expresión determinados en este estudio para los diferentes marcadores analizados.

### ***Establecimiento de la concentración celular para el trasplante***

Desde hace varias décadas el trasplante de células ha constituido una vía alternativa de tratamiento para las enfermedades degenerativas en el SN, 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, de ahí que a pesar de su plasticidad este hecho provoque deficiencias funcionales irreversibles. Así, en la EH el cambio patológico que probablemente desempeña el papel principal en la sintomatología de la enfermedad es la muerte de las células gabaérgicas de talla media del estriado (Ferrante, 1985). Esta pérdida ocasiona diferentes alteraciones morfofuncionales, que al parecer son las responsables de los trastornos observados en estos pacientes. Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha levantado 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 EH. El aislamiento de células embrionarias humanas, la aparente e inesperada potencialidad de las células madre adultas y el desarrollo de la terapia génica nos lleva hacia posibles tratamientos de enfermedades incurables como la EH. Las aplicaciones de las células madre se basan, fundamentalmente, en su potencial de diferenciación y su capacidad para servir como vehículo terapéutico de genes. De ahí la importancia de tener una fuente segura y confiable de células para su uso en el injerto celular si se tiene en cuenta que numerosos trabajos presentes en la literatura demuestran la utilidad de las células madre en la recuperación del tejido dañado (Lescaudron, 2003). En el presente estudio se empleó, como fuente de trasplante, células procedentes de la médula ósea de rata. Antes de su uso se estableció la concentración a la cual debían ser utilizadas, para obtener un resultado satisfactorio en cuanto al impacto que estas células pudieran tener sobre las alteraciones conductuales previamente encontradas en el modelo de AQ. Para partir de una concentración adecuada, fue necesario apoyarse en la experiencia previa de trasplantes celulares que habían sido realizados por otro grupo de investigación (Blanco, 2000).

Para este estudio se probaron tres concentraciones diferentes, distribuidas en tres grupos (grupo I: 100 000 cél/μL, grupo II: 200 000 cél/μL, y grupo III: 300 000 cél/μL), demostrando que la menor concentración utilizada era la más apropiada para los trasplantes en el modelo de AQ. Una explicación posible a esta consideración estuvo basada en el análisis de los resultados obtenidos en cada grupo; así en los animales perteneciente al grupo I, con concentración de células de 300 000 cél/μL totales (figura 4A), se observó una supervivencia baja de las células trasplantadas y una respuesta inflamatoria potente. Los resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, que evidencian que en los trasplantes donde la concentración celular a implantar es alta, no logran una buena integración con el tejido hospedero. De igual manera los animales pertenecientes al grupo II con concentración de 200 000 cél/mL totales (figura 4B), mostró un comportamiento similar al grupo I. Aunque la respuesta inflamatoria fue menos potente en este grupo, también se observó una baja supervivencia de las células trasplantadas. A diferencia de las concentraciones anteriores, para los animales pertenecientes al grupo III, con concentración de células de 100 000 cél/mL totales (figura 4C), es decir una concentración menor de células, se pudo apreciar una alta supervivencia celular. Se supone que esta última concentración favoreció la integración y migración de las células, lo que sugiere que, en el lugar donde fueron implantadas,

ellas pueden actuar de manera beneficiosa, si no hay agregación de las mismas en el sitio de la inyección, ya que se favorece el desplazamiento, una vez que se han integrado en el tejido hospedero. Estos resultados permiten afirmar que la concentración celular a utilizar en el trasplante es un parámetro muy importante para lograr una adecuada sobrevivencia e integración de estas células en el tejido hospedero. Por otro lado se piensa, como ya han sugerido otros autores, que el ambiente alrededor del sitio del implante interviene de alguna manera sobre las células que serán 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. Con relación a la respuesta inflamatoria que tuvo lugar en cada uno de los grupos experimentales, se puede señalar que la respuesta más baja fue encontrada en el grupo III, lo cual concuerda con los datos reportados por otros autores, y es congruente con los hallazgos encontrados, donde la máxima migración y sobrevivencia celular tuvo lugar en aquel grupo cuya concentración celular era más baja, lo que favoreció junto a otros factores ambientales que las células no murieran y se integraran mejor al tejido. Esto explica el porqué la respuesta inflamatoria fue menor para este grupo y abundante en los grupos I y II, donde el factor concentración celular, más el daño tisular previo provocado por la lesión AQ, marcó el inicio de una respuesta inflamatoria que fue más potente donde los mecanismos de muerte celular fueron más evidentes.

### ***Evaluación funcional del trasplante de CMO a través de la conducta motora***

#### **Conducta de Giro inducida por D-anfetamina**

En los estudios dirigidos al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EH, así como para la búsqueda de alteraciones que expliquen la fisiopatología de la enfermedad, se han usado diferentes modelos experimentales que tratan de simular sus características clínicas. En el modelo utilizado, la inyección intraestriatal de AQ provoca la muerte de neuronas en el área lesionada, lo cual induce un déficit de la conducta motora (Hantraye, 1990). Para evaluar los trastornos conductuales que aparecen en este modelo, se pueden utilizar diferentes pruebas. Para este estudio se realizaron las rotaciones inducidas por D-anfetamina, como predictoras del grado de déficit motor presente en los animales, tanto antes de realizar el trasplante de CMO como después de este. La conducta motora en esta prueba es dosis dependiente

y usualmente se acompaña de episodios de rotaciones en barril, las cuales han sido relacionadas con un incremento de la actividad de la dopamina en el estriado (Marrannes, 1988). Los animales controles también fueron sometidos a esta prueba con el objetivo de observar su conducta, aun cuando no hay posibilidades de obtener una asimetría como la encontrada en los animales lesionados. Este grupo control mostró una conducta estereotipada típica, que fue debida a la reacción que tiene un cerebro intacto ante la acción de un agonista dopaminérgico. La gráfica representada en la figura No. 5 muestra la conducta de giro antes y después del trasplante de CMO, donde se puede constatar que antes del trasplante los animales lesionados desarrollaron una actividad rotatoria ipsilateral al hemisferio lesionado que contrasta con la conducta que aparece en los animales sanos descrita anteriormente. La explicación a esta conducta hiperkinética clásica en los animales lesionados es debida a la pérdida de las proyecciones gabaérgicas inhibitorias, ya descrita por otros autores (Hantraye, 1990). Un hallazgo interesante para el grupo de lesión con AQ solamente, fue la disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,0093$ ) de la Conducta de Giro, que fue encontrada un mes después de la lesión con el AQ (sin tratamiento con CMO) cuando se comparó con la prueba inicial que se realizó una semana después de la lesión. Este resultado puede indicar la presencia de regeneración espontánea de la lesión, lo cual ya ha sido descrito por otros autores, y traduce la existencia en el organismo de mecanismos compensatorios propios que ayudan a reparar parcialmente el tejido lesionado.

En el presente estudio también se observó que, un mes después, los animales que recibieron trasplante de CMO mostraron una disminución significativa en la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina, lo que habla a favor de la efectividad del trasplante de CMO sobre el área lesionada. Estos resultados están en línea con los de otros autores que afirman que el trasplante de CMO mejora los trastornos conductuales en los animales lesionados con AQ (Lescaudron, 2003).

Para explicar este efecto conductual, es necesario apoyarse en la idea de que las CMO trasplantadas son capaces de diferenciarse de otros tipos celulares, que no son del tejido que ellas originan, sino que tienen la potencialidad de convertirse en células del tejido nervioso (Sánchez Ramos, 2000). Este hecho puede ser responsable, al menos en parte, de la recuperación motora vista en el grupo experimental después del trasplante de CMO. Por otro lado, la acción positiva del trasplante puede estar modulada también por la producción de diferentes factores neurotróficos, por parte de las CMO trasplantadas, que ejercen su acción

sobre las células que están en vía de muerte y/o que circundan los tejidos lesionados. Estos factores potencian la supervivencia de las neuronas, favorecen su diferenciación y funcionamiento e inducen a la formación de sinapsis. En la literatura se han publicado datos referentes a la producción por parte de la CMO de factores neurotróficos, tales como el BDNF (Dormady, 2001); por tanto, este podría ser otro mecanismo a través del cual se pueda explicar cómo estas células revierten los efectos de la lesión producida por el AQ en el estriado.

### **Prueba de las habilidades motoras de las extremidades anteriores**

La prueba de la escalera es una tarea eficaz para evaluar el uso de las extremidades anteriores, y se ha considerado una prueba compleja de conducta sensorimotora (Whihaw, 1992; Pavón, 1998), que depende de la integridad del circuito intrínseco córtico-estriato-palidal (Montoya, 1990, Montoya, 1991). En el experimento hecho se observó que la lesión unilateral del estriado con AQ provocó una mayor dificultad en la utilización de las extremidades anteriores tanto derechas como izquierdas en aquellos grupos que presentaban lesión con AQ, cuando se compararon con los controles sanos. Cuando se aplicó este paradigma a los animales lesionados se detectó que el deterioro encontrado en las extremidades anteriores, reflejaba el daño que ocasionó la pérdida neuronal provocada por la lesión de AQ en el estriado. Igualmente, que las alteraciones fueron localizadas en ambos miembros superiores, sin predilección por uno de ellos, lo cual pudo ser debido al 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 del animal (Montoya, 1990; Pavón, 1998). También se demostró que después del trasplante de CMO los animales mejoran en el empleo del uso de las extremidades anteriores, por lo que con esta prueba se evidencia también el efecto positivo del trasplante de CMO sobre el área lesionada. De manera general, los resultados obtenidos están en concordancia con lo reportado por otros autores que ya han utilizado esta prueba para medir el déficit motor producido por la lesión y la recuperación de este tras un trasplante de células madre (Pavón, 2004). Los mecanismos por medio de los cuales aparece la mejoría significativa en estos animales, están muy relacionados con los explicados en la prueba de la Conducta de Giro inducida por D-anfetamina. Para este caso específico será necesario realizar otros estudios que permitan saber si

estas células trasplantadas se diferenciaron en algún fenotipo neural que haya permitido la reconstrucción de circuitos dañados o que permitan saber si estas células fueron capaces de liberar factores neurotróficos que previenen los cambios degenerativos de las neuronas estriatales y brindan una neuroprotección que reduce el daño estriatal producido por la lesión (Alberti, 2005). Evidentemente se necesita profundizar más en el conocimiento de los mecanismos por los cuales el trasplante de células actúa sobre la zona lesionada, ya que este podría ser una diana farmacológica interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, especialmente la EH.

### **Conclusiones**

La dosis más baja de AQ seleccionada fue capaz de lesionar adecuadamente el estriado, con una menor afectación de estructuras fuera del estriado.

Las células de médula ósea fueron positivas para los marcadores CD34, CD38, CD45 y CD90. Esto sugiere la heterogeneidad de esta población.

La mejor concentración de CMO para el trasplante fue la de 100 000 cél/ml, ya que con ella se obtuvo la mejor supervivencia y migración celular.

Las pruebas conductuales demostraron una mejoría en la conducta motora de los animales trasplantados con CMO. Este resultado sugiere la importancia de las CMO en el recobrado de las funciones perdidas.

### **Referencias bibliográficas**

- Alberti, E., García, R., Serrano, T., Blanco, L., Martínez, L., Mendoza, M. y., et al. 2005. Evaluación de la supervivencia de las células mononucleadas de la médula ósea trasplantadas en un modelo de ratas con lesión estriatal por ácido quinolinico. *Revista de Neurología* 40: 518-522.
- Albin, R. L., Young, A. B., Penney, L. B., Handelin, B. and Balfour, R. 1990. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *The New England Journal of Medicine* 322: 1293-1298.
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Masurek, M. F., Swartz, K. J. and Martin, J. B. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168-171.
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Swartz, K. J. and Kowall, N. W. 1991. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience* 11: 1649-1659.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W. and Miller, J. M. 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *The Journal of Neuroscience* 13: 4181-4192.

- Boer, G. J. 1994. Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and research. Network of European CNS Transplantation and Restoration (NECTAR). *The Journal of Neuroscience* 242: 1-13.
- Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K. and Sanberg, P. R. 1997 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21: 289-293.
- Brazelton, T. R., Fabio, M., Rossi, V., Keshet, G. L. and Blau, H. M. 2000. From marrow to brain: Expression of Neuronal Phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P and et al. 1999. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *Cell* 19: 3248-3257.
- Colter, D. C., Sekiya, I. and Prockop, D. J. 2001. Identification of subpopulation of rapidly self-renewing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7841-7845.
- Coyle, J. T. and Schwarcz, R. 1976. Lesion of striatal neuron which kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263: 244-246.
- Curry, D. J., Wright, D. A., Lee, R. C., Kang, U. J. and Frim, D. M. 2004. Surfactant poloxamer 188-related decreases in inflammation and tissue damage after experimental brain injury in rats. *Journal of Neurosurgery* 101: 91-96. Dormady, S. P., Bashayan, O., Dougherty, R., Zhang, X. M. and Basch, R. S. 2001. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 10: 125-140.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Beal, M. F., Richardson, E. P., Bird, E. D. and Martin, J. B. 1985. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230: 561-563.
- Francis, T., Cruz, R., Antunez, I. y Rosillo, J. C. 2000. Caracterización conductual de un modelo de enfermedad de Huntington en ratas inducido por ácido quinolínic. *Revista de Neurología* 30: 1016-1021.
- Garrido, C. 2003. Estado actual de la investigación con células madre. *An Pediatr* 59: 552-558.
- Hantraye, P., Richie, D., Maziere, M. and Isacson, O. 1990. A primate model of Huntington's disease: Behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Experimental Neurology* 108: 91-104.
- Hambury, R., Ling, Z. D., Wu, J. and Kordower, J. H. 2003. GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults. *The Journal of Comparative Neurology* 30: 307-316.
- Haynesworth, S., Baber, M. and Caplan, A. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone Marrow Transplant* 13: 69-80.
- Huntington, G. 1872. On chorea. *Medical and Surgical Reporter* 26: 317-321.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M. and Verfaillie, C. M. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Experimental Hematology* 30: 896-904.
- Langman, J. 1997. Embriología Médica. Ciudad de la Habana: Pueblo y Educación; 21-32.
- Leegwater-Kim, J., Cha, J. H. I. 2004. The paradigm of Huntington's disease therapeutic opportunities in neurodegeneration. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics* 1: 128-138.
- Lescaudron, L. 2003. Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's Disease: Behavioral and morphological outcomes. *International Journal of Neuroscience* 113: 945-956.
- Blanco, L., Álvarez, P., Pavón, N., Macías, R., Díaz, L. y González, A. 2000. Microtrasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en estriado y sustancia nigraparsreticulata de ratas hemiparkinsonianas. Estudio Conductual. *Revista de Neurología* 30: 1122-1127.
- Lione, L. A., Carter, R. J., Bates, G. P., Morton, A. J. y Dunnett, S. B. 1999. Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *The Journal of Neuroscience* 19: 10428-10437.
- Long, Y. and Yang, K. Y. 2003. Bone marrow derived cells for brain repair: recent findings and current controversies. *Current Molecular Medicine* 3: 719-725.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington C. and et al. 1996. Exon 1 of the HD gene with and expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87: 493-506.
- Marrannes, R. and Wauquier, R. 1988. Episodic barrel rotations induced by intra-striatal injection of quinolinic acid in rats. Inhibition by anticonvulsants. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 31: 153-162.
- Mason, S. T. and Fibriger, H. C. 1978. Kainic acid lesions of the striatum: behavioural sequelae similar to Huntington's chorea. *Brain Research* 155: 313-329.
- Menalled, L. B. and Chesselet, M. F. 2002. Mouse models of Huntington's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 32-39.
- Montoya, C. P., Astell, S. and Dunnett, S. B. 1990. Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rat. *Prog Brain Res* 82: 459-66.
- Montoya, C. P., Campbell-Hope, L. J. and Dunnett, S. B. 1991. The "Staircase test": A measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 36: 219-228.
- Olney, J. W. 1974. En: *Inheritable disorders at amino acid metabolic*. Nyhan W. L. (ed). Wiley and Sons, New York.
- Olney, J. W., Ho, O. I. and Rhee, V. 1971. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids the infant mouse central nervous system. *Experimental Brain Research* 14 (1): 61-76,

- Pavón, N., Vidal, P., Álvarez, P., Torres, A. y Rodríguez, A. 1998. Evaluación conductual del modelo de lesión unilateral en ratas con 6-hidroxidopamina. Correlación entre las rotaciones inducidas por D-anfetaminas, apomorfina y la prueba de habilidades manuales. *Revista de Neurología* 26: 915-918.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, California.
- Pérez-De La Cruz, V., Elinos-Calderón, D., Robledo-Arratia, Y., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverrí, J., Ali, S. F. and Santamaría, A. 2009. Targeting oxidative/nitrogenic stress ameliorates motor impairment, and attenuates synaptic mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in two models of Huntington's disease. *Behavioural Brain Research* 16: 210-217.
- Prosper, F. y Verfaillie, C. M. 2003. Células madre adultas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 26: 345-56.
- Sánchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo Peláez, F., Hazzi, C., Stedford, T., Willing, A., Freeman, T. B. and et al. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology* 164: 247-256.
- Samberg, P. R. and Coyle, J. T. 1984. **Scientific approaches to Huntington's disease.** *CRC Critical Reviews in Clinical Neurobiology* 1: 1-44.
- Schwarcz, R., Hokfelt, T., Fuxe, K., Jonsson, G., Goldstein, M. and Terenius, L. 1979. Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Experimental Brain Research* 37: 199-216.
- Schwarcz, R., Whetsell, W. O. and Mangano, R. M. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318.
- Seaberg, R. M. and Van Der Kooy, D. 2003. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences* 26: 125-131.
- Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L. and et al. 2000. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11-16.
- The Huntington's Disease collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983.
- Ungerstedt, U. and Acbuthnott, G. 1970. Quantitative recording of rotational behaviour after 6-OHDA lesions of nigrostriatal dopamine system. *Brain Research* 24: 485-493.
- Verfaillie, C. M., Pera, M. F. and Lansdorp, P. M. 2002. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 1: 369-91.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J. and Gage, F. 2001. **Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiation.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 387-403.
- Whishaw, I. Q. 1992. Lateralization and reaching skill related: results and implications from a large sample of long-Evans rats. *Behavioural Brain Research* 52: 45-48.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and Black, I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research* 61: 364-370.
- Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Livingston, A. G., Porada, C. D. and Ogawa, M. 1999. Engraftment and multilineage expression of human bone marrow CD34+ cells in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 872: 220-231.