



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLÓGIA

TÍTULO DE LA TESIS

Terapia Regenerativa Mediante Trasplante de Células
Progenitoras en un Modelo de hemi-Parkinson en
Ratón

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA

PRESENTA:
Ingrid Itzel González Hernández

DIRECTOR: Adán Hernández Cortés



MES Y AÑO
Junio, 2025

Junio, 2025

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM por permitirme hacer uso de sus instalaciones, así como por otorgar la facilitación del material y equipo necesarios para la realización de este proyecto.

Al Dr. Adán Hernández Cortés por dirigir este proyecto, por sus consejos y apoyo personal para que pudiera llevarlo a cabo.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, titular del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, por permitirme formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Edith Espino Saldaña, técnico académico del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, por su apoyo y asistencia técnica.

A la Dra. Alejandra Castilla León y al M.V.Z. José Martín García Servín, de la Unidad de Bioterio, por el apoyo en el alojamiento y cuidados de los animales utilizados en este proyecto.

A la Dra. Deisy Gasca por su apoyo en la Unidad de Análisis Conductual, por sus aportaciones y consejos. Y por su apoyo personal cuando lo necesite.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por brindarme su apoyo y sus valiosos consejos durante mi estancia.

A mis mejores amigas Karla y Oliva por ser un gran ejemplo de mujeres que luchan por sus sueños, por su apoyo, cariño y gran amistad.

DEDICATORIA

A mis abuelos,
por ser el ejemplo de fortaleza, sabiduría y amor incondicional. Sus historias, valores y enseñanzas son el cimiento de mi vida y esta meta alcanzada.

A mi mamá,
mi mayor inspiración y apoyo inquebrantable. Gracias por enseñarme con tu ejemplo que los sueños se alcanzan con esfuerzo, fe y perseverancia. Este logro es tanto mío como tuyo, gracias por confiar en mí y no abandonarme nunca.

A mis hermanos,
compañeros de vida y cómplices de sueños. Su cariño, bromas y apoyo constante han sido una fuente de energía en este camino.

Y a mi novio,
mi compañero de sueños y alegrías, Israel. Gracias por creer en mí, por motivarme en los momentos difíciles y por estar siempre a mi lado con paciencia y amor.

A todos ustedes, con amor eterno, les dedico este esfuerzo, que no habría sido posible sin su presencia en mi vida.

INDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Modelos tóxicos de la Enfermedad de Parkinson.....	8
Modelo de 6 OHDA.....	10
ANTECEDENTES.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares:.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Cultivo celular primario de células progenitoras del epitelio olfatorio humano.....	17
Diferenciación en astrocitos y transducción viral.....	17
Cirugía estereotáxica.....	18
Pruebas conductuales.....	19
Campo abierto.....	19
Footprint.....	¡Error! Marcador no definido.
Rota-rod.....	¡Error! Marcador no definido.
Giro espontáneo.....	21
RESULTADOS.....	22
Aprendizaje motor evaluado con rotarod.....	22
Actividad motora y estereotipias.....	23
Coordinación motora y marcha.....	26
Desbalance motor y conducta de giro.....	27
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

ABREVIATURAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

AdV-GFP - Adenovirus con proteína verde fluorescente

CMV - Cytomegalovirus Promoter (Promotor de citomegalovirus)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EO - Epitelio olfatorio

EGF - Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidérmico)

EP - Enfermedad de Parkinson

FBS - Fetal Bovine Serum (Suero fetal bovino)

GFP - Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente)

GFAP - Glial Fibrillary Acidic Protein (Proteína ácida fibrilar glial)

GABA - Ácido gamma-aminobutírico

hESC - Human Embryonic Stem Cells (Células madre embrionarias humanas)

IL-6 - Interleucina-6

L-DOPA - Levodopa (Precursor de la dopamina)

LTP - Long-Term Potentiation (Potenciación a largo plazo)

MFB - Haz medial del prosencéfalo

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MSN - Medium Spiny Neuron (Neurona espinosa mediana)

MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridinio

NPC - Neural Progenitor Cell (Célula progenitora neural)

OE-MSCs - Olfactory Ecto-Mesenchymal Stem Cells (Células madre ecto-mesenquimales olfatorias)

OSN - Neuronas sensoriales olfativas

PBS - Phosphate Buffered Saline (Solución salina tamponada con fosfatos)

SNc - Sustancia negra compacta

SNpc - Sustancia negra pars compacta

SUS - Células sustentaculares

UV - Ultravioleta

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de la función dopaminérgica en el caudado-putamen (estriado) debido a una muerte selectiva de neuronas de la sustancia negra compacta (SNc). A pesar de los grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología de la EP a través de modelos animales, aún no se cuenta con marcadores tempranos y terapias de recuperación sólidas. Uno de los modelos murinos más usados se basa en la muerte selectiva mediante la inyección de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Con el presente proyecto, estandarizamos un modelo basado en el uso de 6-OHDA en ratón macho adulto C57 mediante la administración en el estriado (vía cirugía estereotáxica). A diferencia de la administración directa en la SNc, la denervación dopaminérgica es progresiva y parcial, y requiere al menos 3 a 4 semanas de consolidación. La evaluación del daño generado fue evaluado a través de una batería de pruebas conductuales que incluyen campo abierto, rotarod, análisis de huella (footprint) y conducta de giro espontánea. Los resultados obtenidos indican un incremento en el giro ipsilateral, cambios en la marcha y en la trayectoria, lo que afecta el desplazamiento en campo abierto desde las 4 semanas posteriores a la lesión y hasta por 8 semanas. La terapia regenerativa ha surgido como una estrategia prometedora, ofreciendo la posibilidad de restaurar las células dopaminérgicas dañadas y recuperar la función motora perdida. A diferencia de los grupos que están trasplantando neuronas dopaminérgicas diferenciadas, con el presente proyecto determinamos el impacto que tiene el trasplante de células con fenotipo de astrocitos derivados del epitelio olfatorio humano en la recuperación del daño neurológico, al menos 8 semanas posteriores al trasplante, para determinar el papel trófico de los astrocitos trasplantados en la recuperación de la inervación dopaminérgica a partir de las fibras remanentes y de los niveles de dopamina de forma indirecta. Los resultados obtenidos indican recuperación parcial del giro espontáneo con respecto a los animales no trasplantados. En resumen, existe una recuperación parcial del daño neurológico asociado al trasplante de células progenitoras.

Palabras clave: hemi-Parkinson en ratón; Progenitores neurales; Terapia regenerativa.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se origina por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta. La pérdida selectiva de la función dopaminérgica provoca una alteración en el funcionamiento de un grupo de núcleos conocido como ganglios basales, lo que a su vez provoca alteraciones motoras como temblor en reposo, rigidez y bradicinesia. A pesar de que se ha estudiado ampliamente la etiología de este padecimiento en diferentes modelos animales, no se ha logrado encontrar un tratamiento terapéutico que revierta los daños fisiopatológicos de los pacientes con la enfermedad de Parkinson. Actualmente se emplea el mismo tratamiento farmacológico usado desde hace varias décadas, el cual consiste en la restitución de dopamina mediante la administración del precursor conocido como Levodopa, sin embargo, este tratamiento con el tiempo provoca efectos adversos como discinesias que es un peor síntoma que la enfermedad misma. Por esta razón, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas sigue siendo de gran importancia tanto en la investigación científica como en la salud pública. La terapia regenerativa ha surgido como una estrategia prometedora, debido a que ofrece la posibilidad de restaurar las células dañadas y de recuperar la función motora perdida (cita).

En la actualidad, se ha logrado obtener un amplio conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos de la EP, esto es resultado de infinidad de estudios que se han podido realizar durante décadas en modelos experimentales murinos de la EP. Los modelos animales permiten la posibilidad de probar nuevos enfoques terapéuticos ya que gracias a estos se ha podido generar la información necesaria acerca de este padecimiento neurodegenerativo. En estos modelos, principalmente en roedores (Ungerstedt et al; 1974) y en algunos casos también en primates, se puede replicar la mayoría de las características patológicas y fenotípicas de la EP (Blandini et al; 2007).

Modelos tóxicos de la Enfermedad de Parkinson

Diferentes modelos de la EP se basan en la administración sistémica o local (intracerebral) de neurotoxinas capaces de inducir la degeneración selectiva del

sistema dopaminérgico nigroestriatal y representan los modelos clásicos y más antiguos de la EP cuyo objetivo es reproducir los cambios patológicos y de comportamiento de la enfermedad, en roedores o primates.

La administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) corresponde a un modelo sistémico clásico que se ha utilizado en primates y en roedores para provocar un síndrome similar al de la EP (Paterna et al; 2007). La toxicidad selectiva de este compuesto para las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta fue reconocida a mediados de la década de 1980 en jóvenes consumidores de drogas del norte de California. Después de la administración intravenosa de una preparación de un análogo de meperidina narcótica contaminada con MPTP, el MPTP es transformado por la monoaminoxidasa B en su metabolito activo ion 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) que posteriormente y a través del transportador de dopamina (DA) (DAT) se internaliza en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc), donde bloquea la actividad del complejo mitocondrial I. Esto llevó a que innumerables estudios demostraran que, a través de repetidas inyecciones vía intraperitoneal en primates, el MPTP causa un síndrome parkinsoniano, caracterizado por todos los síntomas cardinales de la EP (Langston et al; 1984) sensible a la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Este modelo experimental ha sido utilizado principalmente en primates, mientras que, en roedores, la rata es altamente resistente a este compuesto y el ratón resulta ser más sensible. En este estudio se reportó que al administrar la toxina por vía intraperitoneal mediante inyecciones repetidas en bolo durante un corto período de tiempo (cuatro dosis de MPTP cada 2 h durante 1 día), se provocan las mismas lesiones selectivas observadas en monos tratados con MPTP.

Así mismo, se han propuesto otras toxinas para reproducir los síntomas provocados por la EP, por ejemplo, la rotenona, que es un potente inhibidor del complejo enzimático mitocondrial 1 que causa daño de la vía dopaminérgica asociado con inclusiones citoplasmáticas que recuerdan a los cuerpos de Lewy que contienen ubiquitina y α -sinucleína (acumulación encontrada en pacientes con EP). Cuando se administra crónicamente, se provoca una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.

Otro modelo sistémico de la EP se basa en la administración de paraquat el cual es un herbicida de contacto bupiridilo no selectivo, esta sustancia comparte similitudes estructurales con MPP+ aunque los mecanismos de acción son bastante diferentes.

El paraquat es altamente selectivo para las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, aunque la pérdida de células es generalmente moderada (20-30%) y detectable sólo después de un tratamiento prolongado (Blandini y Thérèse, 2012).

Modelo de 6 OHDA

Los efectos biológicos de la 6-OHDA se demostraron por primera vez por Porter *et al.* (1963) quienes demostraron que este agente era capaz de inducir una depleción eficaz y duradera de los nervios parasimpáticos del corazón. Unos años más tarde se demostró que, era capaz de provocar una degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal cuando se administra en la SNpc, siendo así el primer modelo animal de EP.

La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina con alta afinidad por DAT, a partir del cual se transporta la toxina al espacio citoplásmico de las neuronas dopaminérgicas. La 6-OHDA no cruza la barrera hematoencefálica por lo cual es administrada por medio de una inyección local. Se han desarrollado 3 modelos de lesión para evaluar el proceso neurodegenerativo que provoca: lesión del haz medial del prosencéfalo, lesión intranigral y lesión intraestriatal (Simola *et al.*, 2007).

Al administrar la 6-OHDA en el haz medial del prosencéfalo (MFB), que se conforma de fibras aferentes con origen desde cuerpos celulares de la sustancia negra hasta el cuerpo estriado, se provoca una degeneración anterógrada masiva de la vía nigroestriatal relacionada con agotamiento de dopamina del 90 al 100% en un tiempo de 2 a 3 días posteriores a la inyección, y finalmente, la degeneración de la vía nigroestriatal de manera rápida. Se realiza en forma unilateral ya que la inyección bilateral se asocia con una alta tasa de mortalidad, además de que de esta forma el hemisferio contralateral sirve como control de la lesión. Esta lesión y la lesión intranigral, son útiles para evidenciar los efectos inmediatos de la toxina, sin embargo, al mismo tiempo provocan una degeneración generalizada del núcleo lesionado y, por

tanto, es difícil estudiar los mecanismos de neurotoxicidad de muerte celular provocada por estrés oxidativo a largo plazo (Ungerstedt, 1968).

Una variante del procedimiento original se desarrolló a mediados de 1990, en dicho modelo, la 6-OHDA se inyecta en el cuerpo estriado generando un daño rápido de las terminales estriatales, no obstante, a diferencia del modelo anterior, la pérdida de neuronas del SNpc es progresiva, retardada y el grado de daño es menor, teniendo como resultado la pérdida del 50 al 70% de neuronas funcionales a las 4 y 6 semanas (Sauer y Oertel, 1994)

El mecanismo de acción de la 6-OHDA está relacionado con sus propiedades prooxidantes, ya que, al ingresar a la célula, de manera inmediata sufre estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres (Hernández-Baltazar, Zavala-Flores, & Villanueva-Olivo, 2017).

Gracias al desarrollo de estos modelos de la EP, se han podido estudiar diferentes terapias farmacológicas que buscan revertir los daños ocasionados por la enfermedad. La terapia regenerativa mediante el trasplante de neuronas dopaminérgicas ha ganado relevancia en los últimos años. Se comprobó *in vitro* que, bajo condiciones específicas, dichas células expresan proteínas asociadas al fenotipo de neuronas dopaminérgicas. Además, al ser despolarizadas, liberan dopamina y metabolitos relacionados. Utilizando un modelo de ratas hemiparkinsonianas inducidas por lesión con 6-hidroxidopamina (6OHDA) en el estriado derecho y trasplantando células derivadas de neuro-esferas del epitelio olfatorio (EO) de donantes sanos en pacientes con Parkinson o en el medio de cultivo, se encontró que las células trasplantadas sobreviven al menos 9 meses. Estas células expresan tirosina hidroxilasa y el transportador de dopamina. Así mismo, las ratas que recibieron trasplantes de células de donantes sanos mostraron una reducción en las vueltas ipsilaterales en la prueba de rotación inducida por amfetamina, efecto que no se observó en los animales que solo recibieron medio de cultivo. Estos resultados sugieren un papel funcional de las células trasplantadas (Murrell *et al.*, 2008).

Uno de los estudios más recientes sobre terapia celular demostró que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (mDA) obtenidas a partir de células madre embrionarias humanas (hESC, por sus siglas en inglés) pueden integrarse de manera

anatómica y funcional al circuito nigro-estriatal tras ser trasplantadas en el estriado y en la sustancia negra (Xiong *et al.*, 2020). Esta integración permitió la recuperación de comportamientos alterados en un modelo de hemi-Parkinson en ratones, evaluado mediante pruebas de Rotarod y conducta de giro. Sin embargo, la fuente de células y los protocolos de diferenciación siguen siendo un reto.

El epitelio nasal humano contiene células troncales que se encargan de la regeneración del epitelio olfatorio regular o ante un daño durante toda la vida. Las células del epitelio olfatorio poseen características de células progenitoras neurales en el medio de cultivo, esto permite considerar al epitelio olfatorio una buena opción como fuente de células para su uso en terapias regenerativas. Otra ventaja es que su obtención es relativamente sencilla y poco invasiva, ya que se pueden obtener a partir de donantes adultos a través de un exfoliado de la mucosa nasal (Benitez-King *et al.*, 2011).

El epitelio olfatorio humano está especializado en la percepción del olor y se localiza en la parte superior de la cavidad nasal, está conformado por: células sustentaculares (SUS) y células microvellosas que proveen de sostén, las neuronas sensoriales olfativas (OSN) maduras e inmaduras responsables de la detección de olores, glándulas de Bowman, las células basales horizontales y globosas (HBC y GBC) y por último, las células olfatorias envolventes (OEC), las cuáles son morfológica y funcionalmente parecidas a las células de Schwann (Chen *et al.*, 2014; Schwob *et al.*, 2017; Lavoie & Smiley 2017).

Las células basales horizontales y las células basales globosas se encargan de restituir el epitelio olfatorio a lo largo de la vida del mamífero adulto ya que representan la población progenitora neural. Las HBC se caracterizan por tener una autorrenovación y replicación lenta. Estas se activan cuando existe daño tisular regenerando algunos tipos de células epiteliales. Por otra parte, las células basales globosas (GBC) son las principales células progenitoras del epitelio olfativo (EO) y generan principalmente neuronas sensoriales olfativas (OSN) y células de soporte (SUS). Diversos estudios han evaluado la capacidad multipotencial de estas células progenitoras neurales (NPC), demostrando su capacidad de división y diferenciación *in vitro* tanto en neuronas como en células gliales (Jiménez-Vaca & García- Tamayo

2018). Por lo anterior, en el presente proyecto queremos determinar la capacidad de astrocitos derivados del EO humano para recuperar el daño neurológico inducido en un modelo de hemi-Parkinson en ratón.

ANTECEDENTES

Las células gliales más abundantes del SNC son los astrocitos. Según Matías et al. (2019), los astrocitos desempeñan funciones fundamentales en la homeostasis y en el soporte metabólico del sistema nervioso central. Actúan en el mantenimiento del equilibrio iónico, en la regulación de neurotransmisores y en la provisión de energía a las neuronas, siendo esenciales para el funcionamiento adecuado del tejido nervioso.

Westergard & Rothstein en el 2020, destacan que los astrocitos también cumplen un rol crucial en la defensa frente a lesiones y enfermedades neurológicas. Son capaces de modificar su morfología y función en respuesta al daño, lo que indica su papel en la neuroprotección y en la regulación de la inflamación cerebral. Además, participan activamente en la comunicación entre neuronas, afectando la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal.

Durante un tiempo se distinguieron solo dos tipos morfológicos de astrocitos: los astrocitos protoplasmáticos, que se encuentran en la sustancia gris, y los astrocitos fibrosos, presentes en la materia blanca (Pestana & Edwards, 2020). Sin embargo, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, se han identificado otros tipos de astrocitos, como los astrocitos interlaminares, ubicados en las capas III y IV de la corteza, y los astrocitos de proyecciones varicosas en las capas V y VI (Vasile et al., 2017).

Las células precursoras neuronales (NPCs), además de ser un modelo ideal para la investigación debido a su capacidad de diferenciarse en células neuronales y gliales, tienen la habilidad de integrarse en los sitios de implantación (Rumajogee *et al.*, 2018). Estas células establecen comunicación con las células circundantes, promueven la neurogénesis y contribuyen a la regeneración del tejido cerebral lesionado, según lo observado en un modelo murino de isquemia causada por hipoxia.

Entre los enfoques explorados dentro de los trasplantes celulares, se ha reportado éxito en la implantación de progenitores de células gliales obtenidos de fetos humanos de entre 17 y 22 semanas de gestación. Estudios de inmunohistoquímica han confirmado que estas células pueden mantenerse en estado progenitor o diferenciarse en astrocitos, alcanzando una morfología y complejidad comparables a las de los astrocitos humanos (Han *et al.*, 2014). Estos hallazgos refuerzan la viabilidad del trasplante celular como una estrategia terapéutica para el Parkinson y proporcionan un marco de referencia relevante para la exploración de otras fuentes celulares, como el epitelio olfatorio, cuyo potencial en la regeneración neuronal y la modulación del microambiente del núcleo estriado podría representar un enfoque innovador en la búsqueda de tratamientos efectivos.

Klein *et al.*, 2009, analiza cómo la lesión unilateral del estriado por 6-OHDA afecta el patrón de marcha en ratas, y cómo la intervención con trasplante de células progenitoras dopaminérgicas fetales puede modificar este patrón. El estudio muestra que las ratas con lesión unilateral por 6-OHDA presentan una alteración en la marcha, especialmente en la fase de apoyo del pie ipsilateral y en el tiempo de balanceo. Estas alteraciones se evidencian en la reducción de la longitud de paso y en la disminución de la cadencia, lo que refleja una dificultad en la locomoción normal. El trasplante de células dopaminérgicas fetales mejora la marcha en estos animales, restaurando parcialmente los parámetros de locomoción, sin embargo, el trasplante promueve la recuperación del equilibrio y la estabilidad de la marcha, pero no mejora el patrón de marcha arrastrada asociado con las lesiones de 6-OHD.

En este mismo artículo se realizó la conducta de prueba de rotación inducida por fármacos, las inyecciones de apomorfina y anfetamina provocaron un incremento importante en el número de giros unilaterales en todas las ratas con lesiones hemi-Parkinson.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que representa un desafío significativo para la salud pública debido a la falta de terapias curativas. Este proyecto busca abordar una necesidad crítica en la investigación de la EP, desarrollar modelos experimentales que emulen la progresión de la enfermedad de la manera

más precisa posible de forma que, permita proponer estrategias terapéuticas innovadoras, como el trasplante celular.

Diversos tipos de células, como las basales horizontales, las basales globosas, las células madre mesenquimales, tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas tanto en condiciones de cultivo como en organismos vivos. Murrell et al., en 2008 investigaron el potencial de las células madre olfatorias en modelos animales de la enfermedad de Parkinson. Los resultados indicaron que estas células podrían diferenciarse en neuronas dopaminérgicas y mejorar los síntomas motores en ratas con Parkinson inducido, respaldando su uso potencial en terapias celulares para esta enfermedad.

Además, estas células pueden liberar factores neurotróficos que desempeñan un papel clave en procesos neurogénicos, como la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular. Se ha demostrado que, en condiciones de cultivo, las células del epitelio olfatorio liberan factores neurotróficos que favorece en la neurogénesis en hipocampo al ser adicionados al medio de cultivo de progenitores neurales de hipocampo murino (Gómez-Virgilio *et al.*, 2018).

Aunque existen diversas técnicas como los trasplantes en las terapias regenerativas, la mayoría se han enfocado en la restauración del tipo neuronal afectado como el caso de las neuronas dopaminérgicas en modelos de hemi-Parkinson obteniendo resultados preclínicos prometedores, sin embargo, pocos se han llevado al tratamiento en humanos. En la presente propuesta nos enfocamos en explorar y desarrollar una estrategia diferente que consiste en aprovechar las propiedades de las células del epitelio olfatorio para diferenciarse en astrocitos *in vitro*, y su capacidad para liberar factores neurotróficos. Proponemos que el trasplante de dichas células en el lado lesionado de un modelo de hemi-Parkinson, favorecerá la re-inervación dopaminérgica restaurando el daño neurológico inducido por la lesión

HIPÓTESIS

La terapia celular de astrocitos derivados del epitelio olfatorio humano ayuda a recuperar la inervación dopaminérgica y la función motora perdida en un modelo de hemi-Parkinson.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de los trasplantes celulares derivados del epitelio olfatorio sobre el daño neurológico en un modelo de lesión de hemi-Parkinson

Objetivos particulares:

- 1.- Generar un modelo de lesión que replique los síntomas de la enfermedad de Parkinson
- 2.- Evaluar conductualmente el daño neuronal ocasionado.
- 3.- Trasplantar astrocitos derivados del epitelio olfatorio.
- 4.- Evaluar el efecto del trasplante sobre el daño neuronal a través de pruebas de conducta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos en animales fueron realizados bajo los lineamientos y reglamento del comité de bioética y manejo de animales del laboratorio del Instituto de Neurobiología de la UNAM (protocolo 120.A, norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999). Se utilizaron ratones macho Balb C57 de 2 meses de edad con un rango de peso entre 19 y 26 gr. Se formaron 2 grupos experimentales (sham y lesionados) cada uno con 9 ratones los cuales fueron alojados en un entorno de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con libre acceso a comida y agua.

Cultivo celular primario de células progenitoras del epitelio olfatorio humano

Se utilizaron células progenitoras del epitelio olfatorio de donadores sanos, colectadas por el laboratorio de la Dra. Benítez-King. Las células del epitelio olfatorio humano (EOh) se mantuvieron en congelación (-80°C) en un medio de criopreservación compuesto por DMEM F-12, suplementado con FBS 20%, glutamina 1%, anti-anti al 1% y DMSO al 7%). La descongelación de las células se realizó aproximadamente una semana antes del xenotrasplante (trasplante de células, tejidos u órganos entre especies diferentes). El vial de células congeladas se colocó en baño María (37°C) para realizar un descongelamiento rápido e inmediatamente diluir en un frasco T-25 (para evitar el efecto adverso del DMSO) que contenían 5 ml de medio de mantenimiento (DMEM F-12 suplementado con FBS al 10%, glutamina 2%, anti-anti al 1%) previamente equilibrado en una incubadora con control de temperatura (37°C) y CO₂ (5%). Alrededor de 4 a 12 horas después, se cambió el medio de mantenimiento con la finalidad de eliminar el DMSO remanente.

Posteriormente se realizaron 1 o 2 pases según fue necesario para permitir la propagación de las células. El levantamiento de células para realizar un pase se llevó a cabo mediante un lavado con PBS 1X, posteriormente se incubaron alrededor de 10 minutos con tripsina y finalmente se inactivó la tripsina mediante la adición de medio DMEM F-12 suplementado con SFB, posteriormente se procedió a sembrar la cantidad de células calculadas en diferentes frascos T-25. El conteo de células se realizó para determinar el volumen de suspensión viral requerida de acuerdo con la titulación establecida (Leyva, B. 2024).

Diferenciación en astrocitos y transducción viral

Resultados previos del laboratorio han establecido que la expresión de GFP alcanza su máximo 72 hrs posterior a la inoculación del virus (Leyva, B. 2024), de igual forma se ha demostrado que 72 hrs de incubación de las células progenitoras en el medio comercial AM (Astrocyte Medium) de science cell, promueve la expresión de GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein) sugiriendo la diferenciación en astrocitos.

Las células fueron transducidas con un vector viral (adenovirus) que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (AdV-GFP) bajo el control del promotor

del citomegalovirus (CMV). En el trabajo de maestría desarrollado por Leyva, B. (2024) se determinó la cantidad de partículas virales requeridas que permiten un 80% de eficiencia de transducción de la proteína GFP en estas células, por tanto, se agregó al medio de cultivo una suspensión viral a razón de 4.3×10^3 partículas virales por célula.

Cirugía estereotáxica

Todo el material utilizado durante la cirugía estereotáxica fue previamente esterilizado mediante autoclave o exposición en UV. Posteriormente se montó en el sistema estereotáxico un sistema de inyección que consta de un tubo de silicona adaptado a una jeringa Hamilton y una cánula guía que nos permite inyectar la 6-OHDA dentro del estriado de ratón adulto. Los sujetos fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/Xilazina en una dosis de 60 mg/kg de ketamina y 18 mg/kg de Xilazina. Se fijó la cabeza del ratón anestesiado en el adaptador estereotáxico. Una vez que la cabeza se mantuvo fija e inmóvil, se procedió a limpiar la zona con alcohol y se retiró el pelaje con ayuda de unas tijeras. Se realizó un pequeño corte en la piel para exponer el cráneo, se retiró el tejido conectivo y se identificó bregma como punto de referencia. Se realizaron tres trépanos en el hemisferio derecho del cráneo para situar los sitios de inyección sobre el núcleo estriado con ayuda de un taladro, utilizando las siguientes coordenadas con respecto a bregma, anteroposterior (AP): +1.2; 0.5; 0.0 mm; Lateral (L): -1.6; -1.8; -2 mm y dorsoventral (DV): 2.2; 1.7; 2 mm de acuerdo con el atlas del cerebro de ratón de Paxinos & Franklin (2008). El grupo lesionado recibió en cada sitio de inyección, 1 microlitro de 6-OHDA con ayuda de una jeringa Hamilton (Hamilton Company, USA). La solución de 6-OHDA se preparó en solución salina y ácido ascórbico (0.2%) a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Al grupo control se le administró el vehículo (solución salina al 0.2% de ácido ascórbico). Finalizada la administración intraestriatal, se permitió la libre difusión del volumen administrado por al menos 5 minutos antes de retirar la cánula. Al término de la administración, se procedió a suturar la incisión para posteriormente llevar al organismo a recuperación por aproximadamente 15 a 20 min. Una vez que los ratones se recuperaron de la cirugía, se trasladaron a la caja familiar y se mantuvieron bajo observación por parte del experimentador una vez al día. Se proporcionó agua y comida molida en un recipiente de fácil acceso hasta su completa recuperación.

Pruebas conductuales

Cuatro semanas posteriores a la lesión, se realizaron las pruebas conductuales que nos permiten determinar el grado de lesión alcanzado por la toxina. En todos los casos, los sujetos de experimentación se habituaron en el cuarto por lo menos 30 minutos antes de cada prueba.

Rotarod

Para determinar el estado basal de la capacidad motora de los ratones, se empleó la prueba de Rotarod, la cual permitió evaluar el aprendizaje motor y la adquisición de habilidades motoras en condiciones basales sobre un rodillo giratorio. El dispositivo utilizado consiste en un cilindro giratorio de plástico con una superficie rugosa que permite a los ratones sujetarse ligeramente. Durante la fase de habituación, en la primera sesión experimental, los sujetos fueron colocados sobre el rodillo sin movimiento durante un período de hasta cinco minutos para facilitar su adaptación. Posteriormente, se inició el protocolo de aceleración, el cual tuvo una duración de dos minutos. En este protocolo, el rodillo giraba inicialmente a una velocidad de 1 rpm, la cual fue incrementando progresivamente hasta alcanzar 120 rpm al finalizar el segundo minuto. Para cada sujeto, se registró la latencia a la primera caída, tras lo cual fueron devueltos inmediatamente a sus jaulas. Antes de cada prueba, los cilindros fueron limpiados con etanol al 70% para garantizar condiciones óptimas de higiene. El procedimiento se repitió con todos los sujetos experimentales hasta completar cuatro repeticiones por día durante tres días seguidos por ratón, asegurando un período de descanso mínimo de diez minutos entre cada repetición.

Campo abierto

Con el objetivo de evaluar el impacto neuronal de la lesión y el trasplante de las células sobre las funciones neurológicas, evaluamos la actividad ambulatoria en

campo abierto, se midió la actividad ambulatoria, estereotipias en tiempo y número de eventos y actividad vertical en tiempo y número de eventos. Como en el estudio se realizó un seguimiento longitudinal, cada grupo tuvo su propio control, es decir, se realizó la misma prueba antes de la lesión en el mismo sujeto, cuatro semanas después de la lesión y del trasplante (8 semanas después de la lesión).

Se empleó el sistema automatizado Superflex, que consta de cuatro arenas de un laberinto de campo abierto (*Open Field*), cada una equipada con cámaras de actividad. Las cámaras están construidas con plástico transparente de alta densidad y no poroso, y cuentan con sensores integrados para registrar la actividad de los sujetos experimentales. Antes de iniciar las pruebas, se cubrió el piso de cada arena con una delgada capa de aserrín, y posteriormente, cada sujeto fue colocado en su respectiva arena. El registro de la actividad, con una duración de 30 minutos, se realizó de manera automática mediante el software Fusión 5, que además fue utilizado para analizar y registrar el movimiento de los sujetos. Este sistema cuenta con tecnología de detección basada en infrarrojos, capaz de captar trayectorias en tres ejes, permitiendo la evaluación de la actividad horizontal y vertical de los animales experimentales.

Análisis de huella

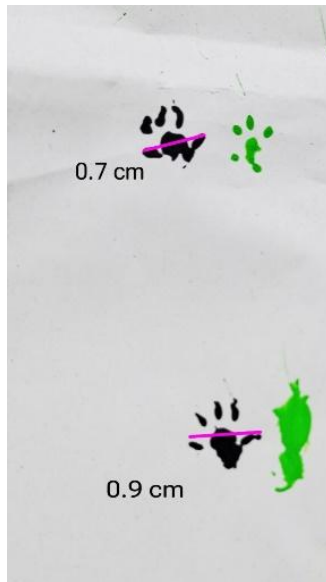


Figura 1. Análisis de huella (Footprint). Con la finalidad de evaluar el efecto provocado por la lesión en la coordinación motora sobre la marcha, se realizó la prueba de footprint. En esta prueba se evaluó la marcha mediante el registro de la pisada con pintura sobre un papel blanco. Se evaluó la apertura de la pisada midiendo la distancia entre las puntas de los dedos extremos laterales a través de la cuantificación del desplazamiento de las extremidades anteriores por medio del marcaje del rastro de las huellas con tinta sobre papel.

El análisis de las huellas o footprint se llevó a cabo con el objetivo de evaluar los patrones de marcha de las extremidades anteriores y posteriores cuatro semanas después de la lesión. Para ello, se usó una pasarela de 94 cm de longitud, 12 cm de ancho y 1.20 cm de alto, con una zona iluminada al inicio y un área oscura al final como destino. Previo a l inicio de la prueba, se aplicó pintura acrílica no tóxica en las extremidades de los sujetos experimentales, utilizando color verde para las patas delanteras y negro para las traseras. Cada animal caminó sobre tiras de papel blanco, lo que permitió registrar el patrón de locomoción. A los animales se les sometió por una ocasión a esta prueba.

Giro espontáneo

Para registrar el comportamiento de giro espontáneo provocado por la lesión de 6-OHDA, los animales se colocaron en una jaula cuadrada acrílica transparente (42 x 42 x 30 cm) elevada a 1,5 m del nivel del suelo. Debajo de la caja de acrílico se colocó una cámara de video (PlayStation Eye, Sony). Cada ratón se colocó en la caja durante 10 minutos y la conducta fue videograbada. Las grabaciones se realizaron a una velocidad de 60 fotogramas/segundo en un ambiente iluminado y silencioso. La caja fue limpiada con alcohol al 75% tras cada prueba. Para cuantificar el número de giros en el campo abierto se utilizó DeepLabCut (v.2.2.0; ResNet-50;

500000 iteraciones de entrenamiento realizadas en el laboratorio de Reprogramación de Circuitos Neuronales de la UNAM). La nariz, el cuerpo y la base de la cola se utilizaron como puntos de referencia para la representación esquelética de la posición

del ratón. El comportamiento de giro se registra calculando el ángulo entre dichos marcadores.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, los datos se sometieron a la prueba de Shapiro para determinar su distribución normal y dependiendo del caso aplicar una prueba t-student o su equivalente no paramétrico. Se realizaron diferentes análisis con los que se compararon grupos independientes aplicando una prueba para datos no pareados y otro tipo de análisis en que se realizó el seguimiento longitudinal del procedimiento, en este caso se aplicó una prueba para datos pareados ya que el mismo sujeto fue explorado en diferentes situaciones. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar ($X \pm SEM$) y se consideró diferencia significativa cuando el nivel de significancia fue < 0.05 . El análisis de resultados y la elaboración de las gráficas se realizó con el software GraphPad Prism 9.

RESULTADOS

Aprendizaje motor evaluado con Rotarod

Durante los tres días en los que se llevó a cabo la prueba de Rotarod, se observó una mejora progresiva en la latencia de caída en los tres grupos experimentales. En cada intento, los sujetos fueron capaces de permanecer por más tiempo sobre el rodillo giratorio, lo que sugiere un adecuado aprendizaje motor y una adquisición efectiva de habilidades motoras. Estos resultados indican que, antes de la inducción de la lesión, los sujetos se encontraban en buenas condiciones de salud y con una función motora intacta (Figura 2).

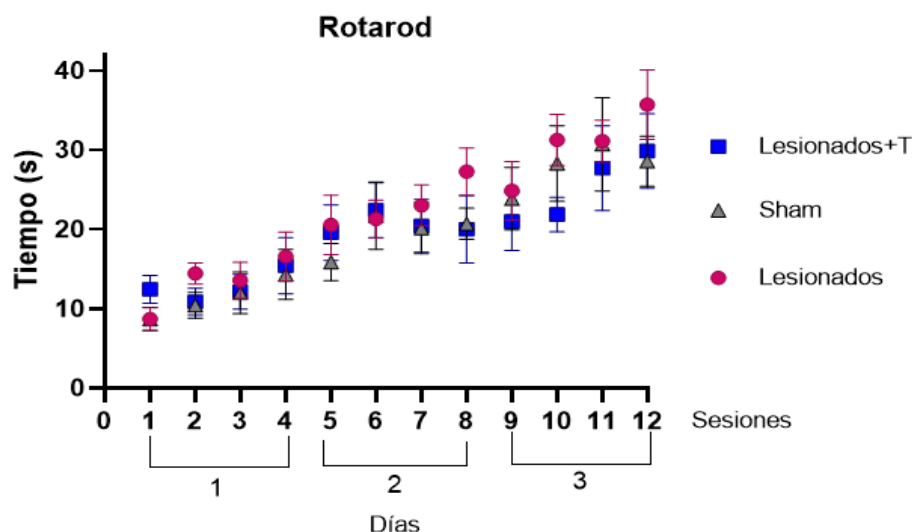


Figura 2. Resumen del desempeño en rotarod durante 12 sesiones separadas en cuatro sesiones por día para los tres grupos que posteriormente formaron parte del grupo de Lesionados, Lesionados + Trasplante y Sham.

Actividad motora y estereotipias

La actividad ambulatoria fue determinada mediante la distancia total recorrida por cada ratón representada en centímetros, sin embargo, solo se tomaron en cuenta los primeros cinco minutos de la prueba. Este período inicial es crucial, ya que refleja la conducta exploratoria de los sujetos mientras reconocen el entorno antes de alcanzar un estado de habituación (Figura 3 A). Como se puede observar, la lesión provocó una disminución significativa de la distancia recorrida ocho semanas posteriores a la lesión en el grupo que solo fue lesionado, mientras que en el grupo que recibió el trasplante esta disminución significativa se presentó desde las cuatro semanas posteriores a la lesión y se mantuvo a las ocho semanas sin recuperación aparente. El grupo sham no presenta ningún cambio significativo, lo que sugiere que la lesión por sí sola no está afectando a la conducta de estos ratones.

Otro parámetro que se puede evaluar en esta prueba es la conducta estereotipada, en donde el acicalamiento o aseo son lo más representativo. Evaluamos el tiempo acumulado de conducta estereotipada realizado durante los primeros cinco minutos

(Figura 3B). El tiempo total de conducta estereotipada en el grupo trasplantado y en el grupo sham no se ve afectada. En el grupo lesionado a las 4 semanas de lesión provoca un aumento de la conducta estereotipada que se recupera a las ocho semanas (Figura 3B). Sin embargo, cuando vemos el número de episodios de conducta estereotipada (Figura 3C), la lesión provoca la disminución del número de episodios estereotipados en los tres grupos a las cuatro semanas, que aparentemente tiende a recuperarse en el grupo trasplantado y sham, aunque no vemos diferencias significativas, mientras que en el grupo lesionado esta disminución se mantiene hasta las ocho semanas posteriores a la lesión.

Otro parámetro que se midió en esta prueba es la actividad vertical que de igual manera se mide en tiempo y en episodios (Figura 3D Y 3E). En el tiempo observamos que a las 4 semanas la lesión no produce ningún cambio importante, sin embargo, a las ocho semanas si se produce una disminución en el tiempo total acumulado de la actividad vertical para ambos grupos, lo cual indica que las células trasplantadas no favorecen la recuperación en este tipo de actividad (Figura 3D). Sin embargo, en el número de episodios verticales la lesión si provoca una disminución significativa tanto en el grupo lesionado como en el grupo trasplantado, la cual se mantiene a las 8 semanas para ambos grupos. Indicando nuevamente que las células no recuperan esta actividad (figura 3E).

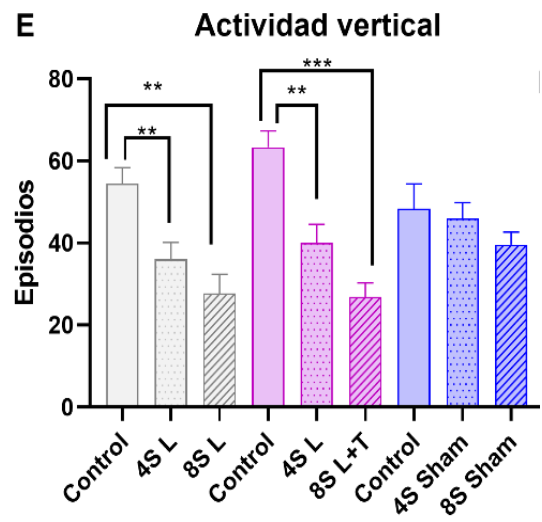
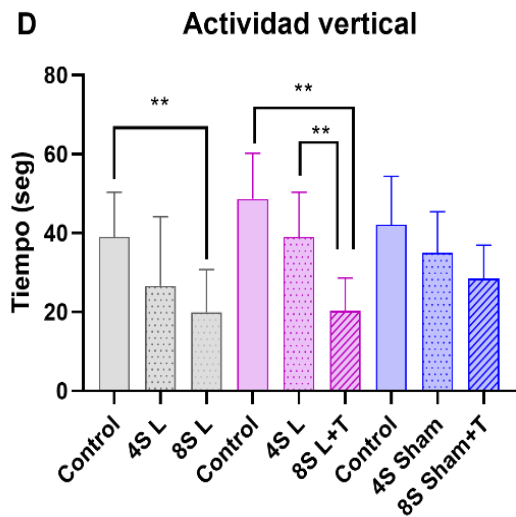
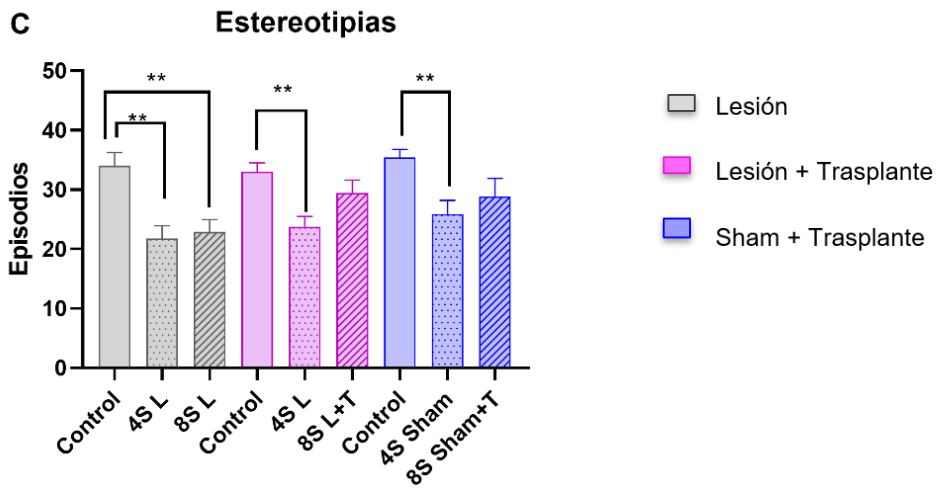
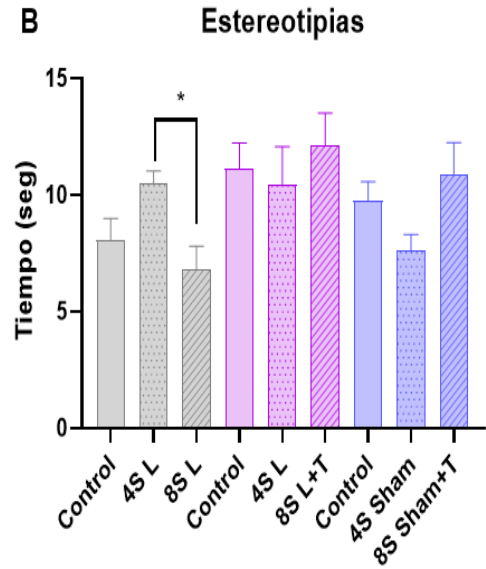
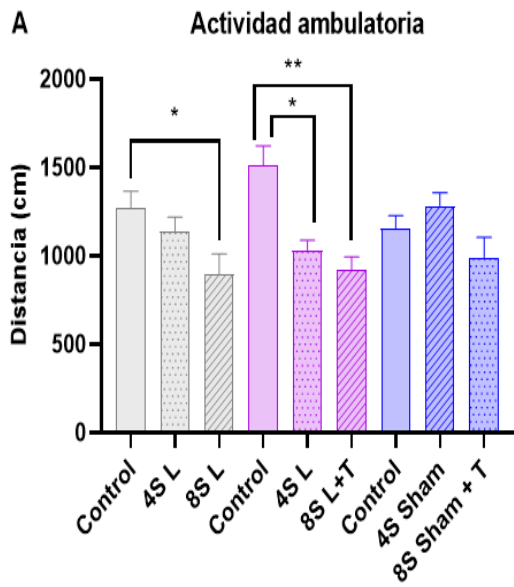


Figura 3. Desempeño en campo abierto en tres grupos (Lesionado, Lesionado + Trasplante y Sham + Trasplante) a las 4 y 8 semanas posteriores a la lesión. A) Distancia total recorrida durante 5 minutos de prueba. El grupo lesionado muestra tendencia a disminuir siendo significativo hasta las 8 semanas posterior a la lesión, mientras que el grupo lesionado + trasplante muestra una disminución significativa desde las 4 semanas de lesión y se mantiene 4 semanas posterior al trasplante. El grupo Sham + trasplante no muestra ningún cambio significativo 4 semanas posteriores a la cirugía y tampoco se ve afectada por el trasplante. B) Tiempo acumulado de la actividad estereotipada durante 5 minutos de prueba, el grupo trasplantado muestra un incremento significativo en la actividad estereotipada a las 4 semanas de lesión y se revierte a las 8 semanas, en caso de los grupos lesionado + trasplante y Sham + trasplante no muestra ningún cambio significativo en las diferentes condiciones. C) Actividad estereotipada en función del número de eventos durante 5 minutos de prueba, el grupo lesionado muestra una disminución significativa del número de episodios desde la semana 4 y se mantiene hasta la semana 8, mientras que el grupo lesionado + trasplante muestra una recuperación de la actividad 4 semanas posterior al trasplante. En el grupo Sham + trasplante se muestra una disminución significativa a las 4 semanas de la cirugía y no se mantiene a las 8 semanas posterior a la intervención. D) Tiempo acumulado de actividad vertical durante 5 minutos de prueba; el grupo lesionado muestra una tendencia a disminuir la actividad que se muestra significativa hasta las 8 semanas posterior a la lesión mientras que el grupo lesionado + trasplante muestra la misma tendencia sin que el trasplante afecte la disminución significativa. El grupo Sham + trasplante no muestra ningún cambio significativo en las diferentes situaciones. E) Actividad vertical en función del número de eventos, el grupo lesionado muestra una disminución significativa desde la semana 4 y se mantiene hasta la semana 8, mientras el grupo lesionado + trasplante mantiene la disminución significativa desde la semana 4 sin que el trasplante afecte dicha disminución. El grupo Sham + trasplante no se ve afectado en ninguna situación. Los datos se muestran como la media \pm error estándar, se aplicó la prueba de *t* de student para grupos pareados * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, grupo Lesionado +Trasplante, $n = 9$; grupo Lesionado, $n = 9$; grupo Sham, $n = 8$).

Coordinación motora y marcha

Para el análisis de huella se comparó la amplitud de la marcha a las 4 y 8 semanas después de la lesión, sin embargo en el grupo lesionado (Figura 4A) no se encontraron diferencias significativas en la apertura de la extremidad izquierda o derecha con respecto al control, aunque si se observa una tendencia a aumentar la distancia de apertura, esto indica que la lesión no provoca cambios en la amplitud de marcha ya que esta misma tendencia se observa en el grupo sham (Figura 4C) en donde tampoco se encuentran diferencias significativas. Mientras que, en el grupo lesionado + trasplante (Figura 4B) se observó la misma tendencia, pero en este caso se presentaron diferencias significativas entre el control vs 8 semanas en el lado contralateral a la lesión, de igual forma en el lado ipsilateral entre el control vs 8 semanas se encontraron diferencias significativas, es decir, después del trasplante, lo que sugiere que el trasplante podría estar incrementando aún más la apertura de ambas extremidades, tanto izquierda y derecha.

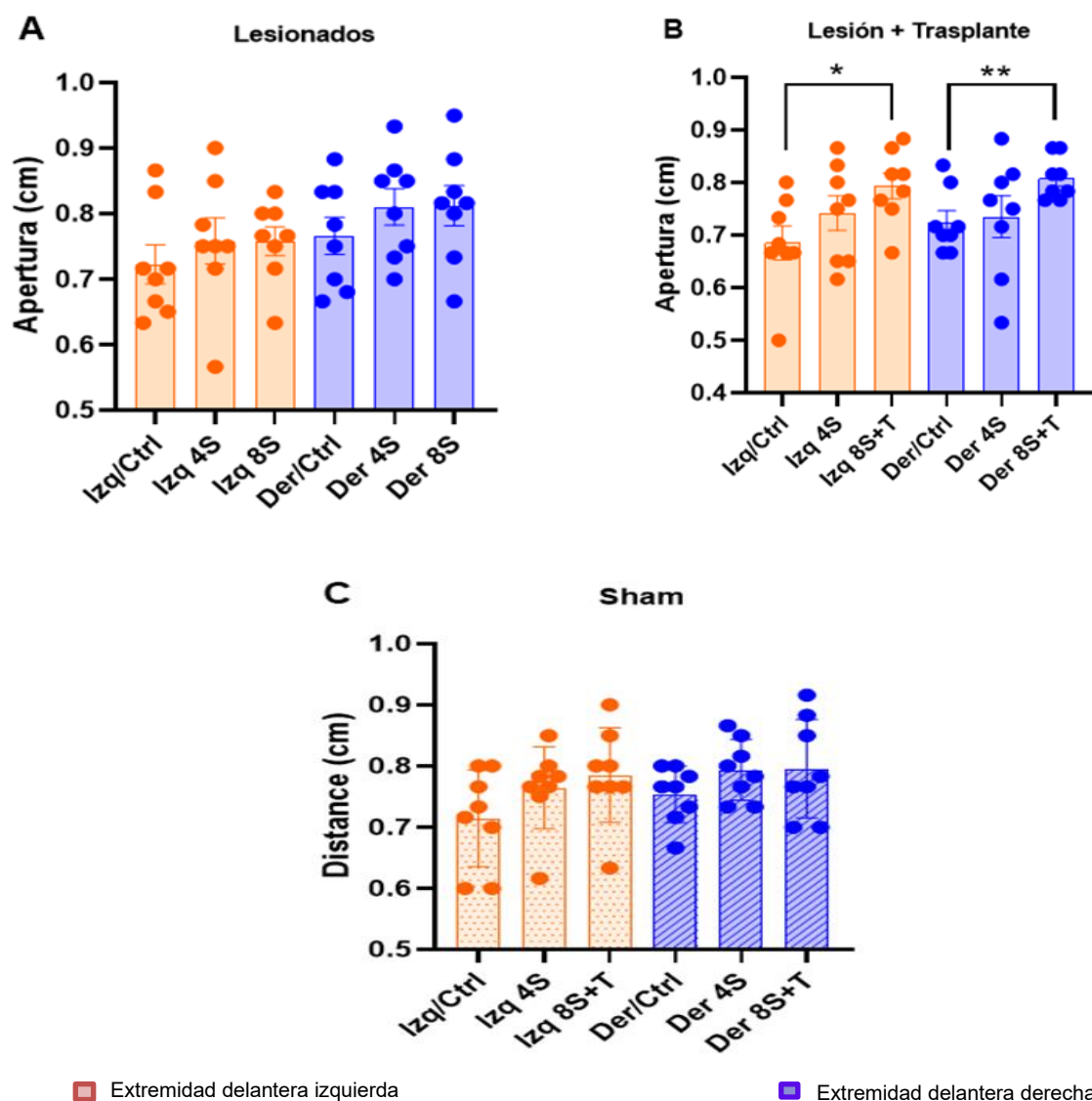


Figura 4. Análisis de huella (footprint). A) Comparación de la amplitud de la marcha a las 4 y 8 semanas después de la lesión, no se encontraron diferencias significativas. B) Comparación de la amplitud de la marcha a las 4 y 8 semanas en el grupo con lesión + Trasplante. Se encontraron diferencias significativas entre el control vs 8 semanas en la extremidad izquierda, contralateral a la lesión; así como también en el control vs 8 semanas en la extremidad derecha, ipsilateral a la lesión. C) Comparación de la amplitud de la marcha a las 4 y 8 semanas. En el grupo Sham no se encontraron diferencias significativas. Lesionados n=8; lesión + T n=8; Sham n=8. (prueba de t de student para grupos pareados *p< 0.05), **p<0.01.

Desbalance motor y conducta de giro

Existe un desequilibrio motor que se ve reflejado en un aumento de giros ipsilaterales cuatro semanas después de la lesión (Figura 5A y 5C), mientras que los giros

contralaterales se ven reducidos en consecuencia (Figura 5B y 5D). El grupo Sham no presentó desbalance motor después de la cirugía, ya que los ratones no presentaron un mayor número de giros en favor de un solo lado (Figura 5E). La prueba se repitió 4 semanas después del trasplante para evaluar el efecto que este tuvo en la respuesta motora, así como en el grupo lesionado (ocho semanas posteriores a la lesión) y en el grupo sham, esto permitió dar un seguimiento longitudinal a los cambios en la conducta provocados por la 6-OHDA y los provocados posteriormente por el trasplante.

Se observó que a las 8 y 12 semanas hubo una disminución de los giros ipsilaterales en ambos grupos (lesionados y lesionados + trasplante) con respecto al control (Figura 5 A y C) sin embargo solo en el trasplante se encontró que esta disminución fue estadísticamente significativa, en consecuencia de esta disminución se vio un aumento que si fue significativo en ambos grupos para los giros contralaterales (Figura 5B y 5D), lo que indica una aparente recuperación parcial del desequilibrio motor inducido por la 6-OHDA, sin embargo en el grupo lesionado esta recuperación no es evidente ya que ni a las 8 ni 12 semanas se encontraron diferencias significativas mientras que en el grupo que recibió el trasplante si se encontraron diferencias significativas tanto para la disminución de giros ipsilaterales como contralaterales. Esto sugiere que el trasplante pudo acelerar la recuperación parcial del equilibrio motor en el grupo trasplantado.

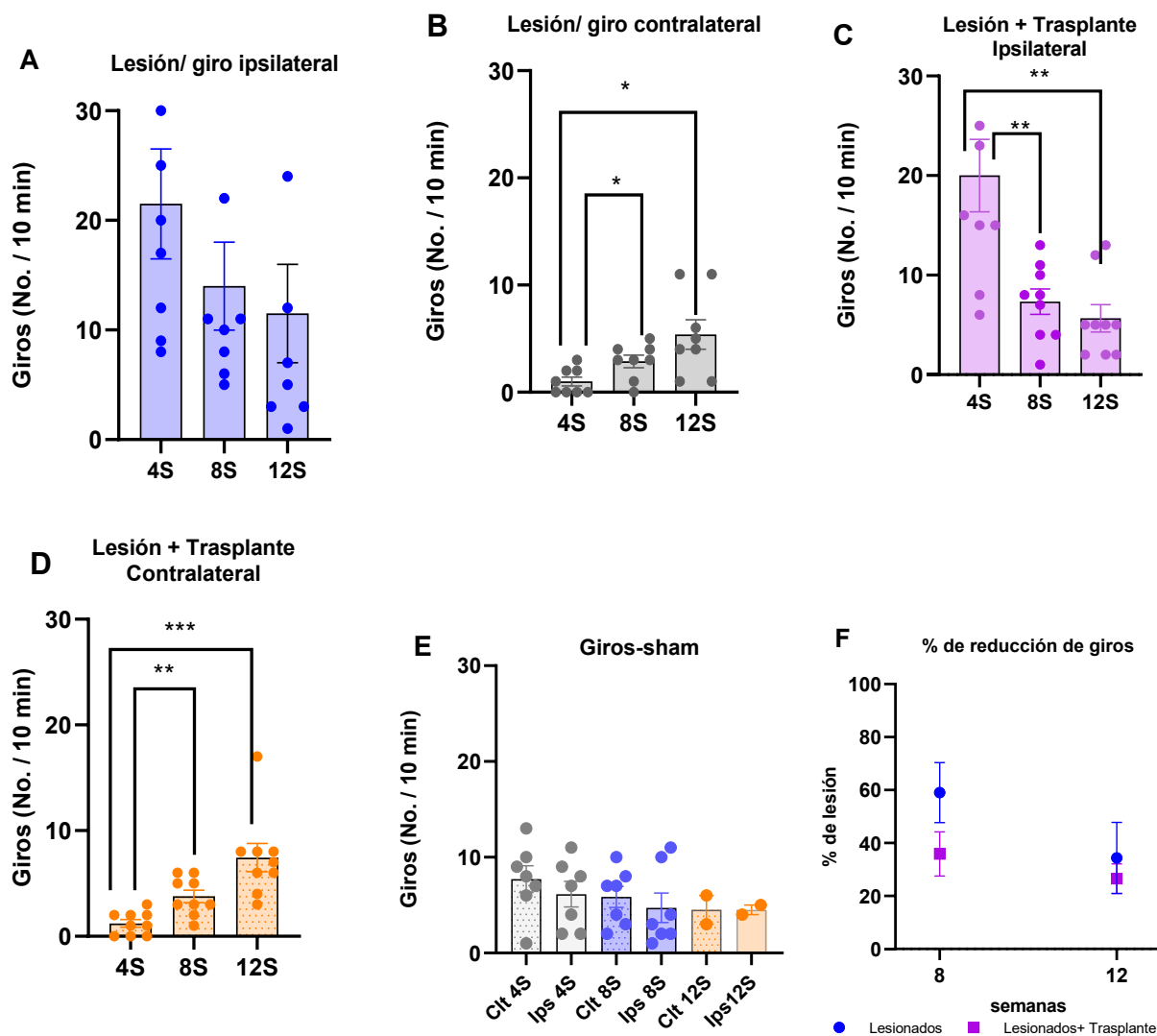


Figura 5. Número de giros contralaterales e ipsilaterales a la lesión durante 10 minutos a las 4 y 8 semanas posteriores a las cirugías. A) Giros ipsilaterales en grupo Lesionado. Desde las 8 semanas después de la lesión se observa una disminución de giros ipsilaterales sin diferencias significativas. B) Giros contralaterales en grupo lesionado. Se encontraron diferencias significativas entre las 4 semanas después de la lesión vs 8 semanas después de la lesión y entre 4 vs 12 semanas después de la lesión. C) Giros ipsilaterales en grupo Lesionado + Trasplante. Hubo una reducción de giros ipsilaterales posterior al trasplante los cuales presentaron diferencias significativas entre 4 vs 8 semanas después de la lesión y entre 4 vs 12 semanas después de la lesión. D) Giros contralaterales en grupo lesionado + Trasplante. Se encontraron diferencias significativas entre las 4 vs 8 semanas después de la lesión y entre 4 vs 12 semanas después de la lesión. E) Giros contralaterales e ipsilaterales en grupo Sham. F) Cociente de giros ipsilaterales/ contralaterales, $L = 19.849$ a las 4 semanas y 1.619 a las 12, $L+T=21.5$ a las 4 semanas y 0.765 a las 12. (Prueba t de student para grupos pareados $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; grupo Lesionado; $n = 9$, grupo Lesión +Trasplante; $n = 9$; grupo; grupo Sham, $n = 8$)

DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó el impacto del trasplante de astrocitos derivados del epitelio olfatorio humano en la recuperación motora de ratones con una lesión unilateral inducida por 6-OHDA en el estriado. Los resultados obtenidos mostraron una recuperación parcial en cuanto a la conducta de giro espontáneo en los animales trasplantados en comparación con los no trasplantados, aunque sin una restauración completa de la función motora. Sin embargo, también se observó esta recuperación en los animales no trasplantados después de 12 semanas, lo que sugiere que este modelo de lesión no es permanente. Estos hallazgos pueden compararse con los obtenidos por Sun et al. (2022), quienes realizaron un análisis longitudinal de la función motora tras la lesión unilateral intraestatal con 6-OHDA en ratones, evaluando diferentes aspectos del comportamiento motor y la degeneración dopaminérgica.

Uno de los principales puntos en común entre ambos estudios es la aparición de alteraciones motoras significativas tras la lesión con 6-OHDA. En ambos casos, los animales presentaron un incremento en los giros ipsilaterales inducidos por la neurotoxina, confirmando el desbalance motor causado por la degeneración dopaminérgica. En el estudio de Sun et al. (2022), este fenómeno se observó durante las primeras semanas post-lesión y disminuyó gradualmente. En el presente estudio, el trasplante celular parece haber contribuido a una mejoría en la conducta de giro, aunque sin una recuperación total, lo que indica que el efecto de los astrocitos trasplantados podría estar limitado o requerir un tiempo de integración más prolongado. El análisis de campo abierto reveló que los ratones lesionados redujeron significativamente la distancia recorrida en la arena, lo que confirma el impacto motor de la lesión nigroestriatal. El grupo trasplantado no mostró una recuperación evidente en la distancia recorrida, pero sí presentó una leve mejora en la actividad exploratoria y en la frecuencia de episodios estereotipados. Esto sugiere que el trasplante celular podría tener un efecto modulador sobre algunos comportamientos motores, pero sin una restauración completa de la movilidad.

Otro hallazgo relevante es la evaluación de la marcha y la actividad motora. Sun et al. (2022) reportaron alteraciones en el patrón de marcha y una disminución en la coordinación motora que se mantuvo hasta seis semanas post-lesión, con una recuperación parcial en las semanas posteriores. En el presente estudio, los

resultados del análisis de huella mostraron que los animales trasplantados exhibieron una mayor apertura en la pisada ipsilateral y contralateral, lo que sugiere un impacto del trasplante en la coordinación motora. Sin embargo, la falta de diferencias significativas en otras pruebas de actividad motora indica que el trasplante no fue suficiente para restaurar completamente la función locomotora, posiblemente debido a un número insuficiente de células trasplantadas o a la ausencia de factores tróficos adicionales. En el estudio realizado por Klein et al.,(2009), se analizaron los efectos de los trasplantes de células progenitoras dopaminérgicas derivadas del mesencéfalo ventral (VM E14) en la recuperación funcional de patrones de marcha tras una lesión inducida por la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas y utilizaron pruebas de comportamiento como: análisis de huella, marcha sobre peldaños de escalera y rotación inducida por fármacos para evaluar déficits motores antes y después del trasplante. En este estudio reportaron que hubo una reducción de errores en el uso de las extremidades contralaterales durante la marcha, sin embargo, el patrón de marcha locomotora no se recuperó por completo. También reportaron una recuperación parcial en el número de giros inducidos por apomorfina. En este estudio, el registro del giro espontáneo mostró que los ratones lesionados realizaron un mayor número de giros ipsilaterales, característico de la degeneración dopaminérgica unilateral inducida por 6-OHDA. En el grupo trasplantado, hubo una disminución significativa en el número de giros ipsilaterales a partir de la semana 8, lo que sugiere una posible restauración parcial de la funcionalidad dopaminérgica. Esto apoya la hipótesis de que los astrocitos trasplantados pueden promover la neuro protección y facilitar la plasticidad neuronal.

En células progenitoras derivadas del epitelio olfatorio, se han identificado factores neurotróficos secretados por hNS/PCs EO cultivadas bajo condiciones específicas de proliferación. Además, se han detectado proteínas asociadas a procesos fundamentales como la migración celular, la proliferación, la diferenciación y el crecimiento de neuritas. Particularmente, se destaca la interleucina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), reconocidos por su papel relevante en la inducción y promoción de la formación de astrocitos (Gómez-Virgilio et al., 2018).

Se ha demostrado que los astrocitos tienen la capacidad de liberar factores neurotróficos y modular el ambiente inflamatorio, lo cual pudo promover una

recuperación parcial en parámetros conductuales como los giros ipsilaterales y la amplitud de la marcha.

No obstante, los resultados no fueron uniformes ni estadísticamente significativos en todas las pruebas, lo que sugiere que la integración y la funcionalidad de las células trasplantadas es moderada y no implica una restauración completa de las vías dopaminérgicas dañadas. Esto evidencia la necesidad de combinar el trasplante celular con otras estrategias terapéuticas para potenciar sus efectos, además de que los estudios revisados reportan trasplantes de más de 100.000 células, por ejemplo, Klein et al., 2009 reportó un total de 400.000 células trasplantadas en cada rata, lo que sugiere otra limitante para el presente estudio y los resultados obtenidos.

Los resultados de ambos estudios, tanto los obtenidos por Sun et al. (2022) como los nuestros, resaltan la importancia del modelo de 6-OHDA en la evaluación de terapias para la enfermedad de Parkinson. Si bien el trasplante de astrocitos derivados del epitelio olfatorio humano muestra cierto potencial en la recuperación parcial de la función motora, su impacto parece ser limitado y no alcanza una restauración total. Los hallazgos de Sun et al. (2022) refuerzan la idea de que existen mecanismos de compensación endógenos en la recuperación motora.

CONCLUSIÓN

En campo abierto, el trasplante de células no revierte la disminución de la actividad ambulatoria provocada por la lesión del estriado.

En cuanto a la actividad repetitiva medida por estereotipias, el trasplante de células no revierte la disminución de estereotipias provocada por la lesión del estriado.

La lesión también reduce la actividad vertical tanto en tiempo como en el número de eventos y el trasplante no recupera esta conducta, por el contrario, parece afectarla aún más disminuyendo el tiempo que invierte en ella.

Los ratones se recuperan el desbalance motor juzgado por el giro ipsilateral y contralateral con el paso del tiempo.

En conclusión, aunque el trasplante celular muestra una potencial opción terapéutica, sus limitaciones resaltan la complejidad inherente de tratar la neurodegeneración y la necesidad de enfoques más integrales para abordar este desafío clínico.

El trasplante de posibles astrocitos derivados del epitelio olfatorio humano muestra ser una buena opción terapéutica según estudios previos, sin embargo, hacen falta muchos más experimentos para demostrar que realmente cumplen un papel de reinervación neuronal, por ejemplo, aumentar significativamente el número de células trasplantadas, esto permitirá una mejor integración de las células y/o una mayor liberación de factores neurotróficos, por otro lado, una vez realizadas las pruebas conductuales presentadas en este estudio se propone realizar otro tipo de pruebas que representen con mayor precisión el daño neuronal ocasionado por la 6-OHDA, como por ejemplo la prueba del cilindro y rotación inducida por apomorfina, además de evaluar otros parámetros en la prueba de marcha sobre una pasarela. Todo esto podría mejorar los resultados obtenidos presentando diferencias estadísticamente significativas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M. S., Romo, F., Calixto, E., Solís-Chagoyán, H., Jiménez, M., Montaña, L. M., Ramírez-Rodríguez, G., Morales-Mulia, S., & Domínguez-Alonso, A. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 201(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.07.009>
2. Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G., & Armentero, M.-T. (2007). Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: New clues from an old model. *European Journal of Neuroscience*, 25(2), 397–405. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05285.x>

3. Blandini, F., & Thérèse, M. (2012). Toxic models of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 48(2), 203-215. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.019>
4. Chen, M., Tian, S., Yang, X., & Lane, A. P. (2014). Anatomy and properties of the olfactory epithelium. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 4(9), 841-846. <https://doi.org/10.1002/alr.21368>
5. Gómez-Virgilio, L., Ramírez-Rodríguez, G. B., Sánchez-Torres, C., & Drucker-Colín, R. (2018). Soluble Factors from Human Olfactory Neural Stem/Progenitor Cells Influence the Fate Decisions of Hippocampal Neural Precursor Cells. *Molecular Neurobiology*, 55(10), 8014–8037. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0906-2>
6. Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Xu, Q., Oberheim, N. A., Bekar, L., Betstadt, S., Alcino, J., Takano, T., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2014). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, 12(3), 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015>. Forebrain
7. Hernández-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). *El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo*. *Neurología*, 32(8), 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.011>
8. Jiménez-Vaca, A. L., & García-Tamayo, F. (2018). Differentiation and multipotential capacities of neuronal progenitor cells. *Revista de Neurología*, 66(1), 25-34. <https://doi.org/10.33588/rn.6601.2017421>
9. Klein, A., Wessolleck, J., Papazoglou, A., Metz, G. A., & Nikkhah, G. (2009). Walking pattern analysis after unilateral 6-OHDA lesion and transplantation of foetal dopaminergic progenitor cells in rats. *Behavioural Brain Research*, 199(2), 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.048>
10. Langston, J. W., Forno, L. S., Rebert, C. S., & Irwin, I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Research*, 292(2), 390–394. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90777-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90777-7)
11. Lavoie, E. G., & Smiley, J. F. (2017). Anatomy and properties of the olfactory epithelium. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 356. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00356>
12. Leyva, B. (2024). *Trasplante de células progenitoras del epitelio olfatorio humano al cuerpo estriado murino*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Matías, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Functions and roles of astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 300. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00300>
14. Murrell, W., Féron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellette, B., ... & Mackay-Sim, A. (2008). In vitro studies on dopamine and cell transplantation.

Brain Research Bulletin, 76(2-3), 184-195.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.024>

15. Paterna, J. C., Leng, A., Weber, E., Feldon, J., & Büeler, H. (2007). DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(4), 698–704.
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300067>
16. Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3rd ed.). Academic Press.
17. Pestana, F., & Edwards, A. (2020). Morphology and adaptability of astrocytes. *Glia*, 68(4), 705-720. <https://doi.org/10.1002/glia.23745>
18. Porter, C. C., & Totaro, J. A. (1963). Biological effects of 6-hydroxydopamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 140(1), 122-129.
<https://doi.org/10.1124/jpet.140.1.122>
19. Rumajogee, P., Altamentova, S., Li, L., Li, J., Wang, J., Kuurstra, A., Khazaei, M., Beldick, S., Menon, R. S., Van der Kooy, D., & Fehlings, M. G. (2018). Exogenous neural precursor cell transplantation results in structural and functional recovery in a hypoxic-ischemic hemiplegic mouse model. *eNeuro*, 5(5), ENEURO.0369-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0369-18.2018>
20. Sauer, H., & Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59(2), 401–415. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90605-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90605-x)
21. Schwob, J. E., Jang, W., Holbrook, E. H., & Lin, B. (2017). Characterization of the olfactory epithelium. *Chemical Senses*, 42(6), 445-461.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjx025>
22. Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 11(3-4), 151–167.
<https://doi.org/10.1007/BF03033565>
23. Sun, X., Li, X., Zhang, L., Zhang, Y., Qi, X., Wang, S., & Qin, C. (2022). Longitudinal assessment of motor function following the unilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion model in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, Article 982218. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.982218>
24. Ungerstedt U. (1968) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, Volume 5, Issue 1, Pages 107-110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
25. Ungerstedt, U., Ljungberg, T., & Steg, G. (1974). Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. *Advances in neurology*, 5, 421–426.

26. Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain structure & function*, 222(5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
27. Westergard, T., & Rothstein, J. D. (2020). Functions and roles of astrocytes. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(5), 263-275. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0290-0>
28. Xiong, M., Tao, Y., Gao, Q., Feng, B., Yan, W., Zhou, Y., ... & Zhang, S. C. (2020). Human embryonic stem cells in treatments. *Nature Biotechnology*, 38(4), 494-499. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0410-6>