



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica  
Instituto de Biomedicina de Sevilla

Tesis Doctoral:

**Xenotrasplantes de cuerpo carotídeo en  
ratones parkinsonianos inmunodeprimidos**

Sonia Romo Madero

Trabajo presentado para optar al grado de doctor por la  
Universidad de Sevilla  
2017



Juan José Toledo Aral y Francisco Javier Villadiego Luque, Catedrático y Prof. Ayudante doctor, ambos adscritos al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla:

CERTIFICAN, que la doctoranda Sonia Romo Madero ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral titulada "Xenotrasplantes de cuerpo carotídeo en ratones parkinsonianos inmunodeprimidos".

Y lo firmamos en Sevilla a 25 de Mayo de 2017,

Fdo. Juan José Toledo Aral

Fdo. Francisco Javier Villadiego Luque

A mi familia y amigos

## **AGRADECIMIENTOS**

De todo corazón me gustaría agradecer a los Dres. Juan José Toledo Aral y Francisco Javier Villadiego Luque, la confianza depositada en mi dándome la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, y por supuesto por toda la ayuda recibida y conocimientos adquiridos.

No puedo olvidarme de agradecer a todos mis compañeros del grupo y personal técnico del centro, por su ayuda y palabras de aliento que me han permitido luchar para alcanzar mis metas.

Y de forma incondicional dar las gracias a mis padres, porque sin ellos no habría llegado a ser la persona que soy hoy.

Un millón de gracias a todos.

*La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y ser ignorante.*  
Miguel de Unamuno

# INDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1. La Enfermedad de Parkinson (EP).....	10
1.1. Fisiopatología de la EP .....	10
1.2. Neuroinflamación en la EP .....	12
1.2.1. Activación microglial .....	14
1.2.2. Activación astrogial .....	15
1.2.3. Oligodendrogliosis .....	15
1.2.4. Modelos animales en la EP y Neuroinflamación .....	16
1.3. Tratamiento de la EP .....	23
2. Terapia celular en la enfermedad de Parkinson .....	24
2.1. Trasplante de agregados celulares de cuerpo carotídeo (CC) .....	25
3. Inmunosupresión en el sistema nervioso central (SNC) .....	31
3.1. Terapia inmunosupresora con Ciclosporina.....	33
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
1. Animales de experimentación.....	40
1.1. Mantenimiento y cuidados generales .....	40
1.2. Modelo de parkinsonismo inducido por la administración crónica de MPTP.....	40
1.3. Protocolos de Inmunosupresión compatibles con el modelo crónico de MPTP..	41
2. Xenotrasplantes intraestriatales de cuerpo carotídeo de rata.....	42
3. Citometría de flujo .....	44
4. Técnicas histológicas .....	46
4.1. Procesamiento del tejido y corte .....	46
4.2. Inmunohistoquímica sobre secciones de criostato en flotación.....	46
4.3. Inmunofluorescencia sobre secciones de criostato.....	48
4.4. Montaje de los cortes.....	49
5. Técnicas de análisis histológico.....	49

5.1. Microscopía confocal .....	49
5.2. Densitometría .....	50
5.3. Técnicas estereológicas .....	51
5.3.1. Estimación del volumen: Método de Cavalieri .....	51
5.3.1.1 Análisis del volumen de cuerpo carotídeo trasplantado .....	52
5.3.2. Cuantificación celular: Disector óptico .....	52
5.3.2.1. Cuantificación del número de neuronas de la SNpc .....	52
5.3.2.2. Cuantificación del número de los oligodendrocitos en el estriado de los ratones xenotrasplantados con CC .....	53
5.3.3. Cuantificación del número y volumen de las células microgliales en el estriado y SNpc .....	53
5.3.4. Estudio de varicosidades dopaminérgicas (TH <sup>+</sup> ) en el Estriado .....	54
6. Análisis estadístico.....	55
 <b>RESULTADOS .....</b>	 <b>56</b>
1. Protocolo de inmunosupresión .....	57
1.1. Determinación de la pauta de inmunosupresión .....	58
1.1.1. Supervivencia y estado general de los animales inmunosuprimidos.....	59
1.1.2. Estudio de los linfocitos T en los animales inmunosuprimidos .....	61
1.1.3. Supervivencia de los xenotrasplantes intraestriatales de CC en los animales inmunosuprimidos.....	65
2. Análisis del efecto de la inmunosupresión en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP.....	66
2.1. Acciones sobre la vía nigroestriatal dopaminérgica.....	67
2.1.1. Análisis de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc.....	67
2.1.2. Análisis de la innervación dopaminérgica del estriado .....	68
2.2. Acciones sobre las poblaciones gliales nigroestriatales .....	71
2.2.1. En el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP .....	71
2.2.1.1. Astrogía .....	71
2.2.1.2. Microglía .....	72
2.2.1.3. Oligodendrogía .....	74

2.2.2. En el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP sometido al tratamiento inmunosupresor.....	75
2.2.2.1. Astroglía .....	76
2.2.2.2. Microglía .....	78
3. Acción beneficiosa de los xenotrasplantes intraestriatales de CC en ratones parkinsonianos inmunodeprimidos .....	80
3.1. Análisis de la evolución general de los animales con xenotrasplantes de CC sometidos a inmunosupresión y parkinsonismo crónico inducido por MPTP.....	81
3.2. Efecto del xenotrasplante de CC sobre la vía nigroestriatal dopaminérgica.....	82
3.2.1. Efecto del xenotrasplante de CC sobre las neuronas de la SNpc .....	82
3.2.2. Efecto del xenotrasplante de CC sobre la inervación estriatal .....	83
4. Análisis del efecto del xenotrasplante de CC sobre las poblaciones gliales .....	85
4.1. Efecto del xenotrasplante de CC sobre la astroglía .....	85
4.2. Efecto del xenotrasplante de CC sobre la microglía.....	86
4.3. Efecto del xenotrasplante de CC sobre la oligodendroglía .....	90
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>93</b>
1. Inmunosupresión en el SNC .....	94
2. Efecto del tratamiento inmunosupresor en modelos experimentales de parkinsonismo .....	97
2.1. Efectos del tratamiento inmunosupresor sobre la degeneración de la vía nigroestriatal dopaminérgica.....	97
2.2. Efectos del tratamiento inmunosupresor sobre los parámetros neuroinflamatorios asociados al parkinsonismo .....	98
3. Efecto neuroprotector de los xenotrasplantes de CC sobre la vía nigroestriatal en animales parkinsonianos .....	99
4. Efectos de los trasplantes intraestriatales de CC sobre las poblaciones gliales.....	100
4.1. Efectos sobre la astroglía .....	101
4.2. Efectos sobre la microglía.....	101
4.3. Efectos sobre la oligodendroglía .....	103
5. Perspectivas futuras.....	104

**CONCLUSIONES ..... 105**

**ANEXOS**

Anexo I : Abreviaturas ..... 108

**BIBLIOGRAFIA ..... 111**

# **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

## 1. La enfermedad de Parkinson

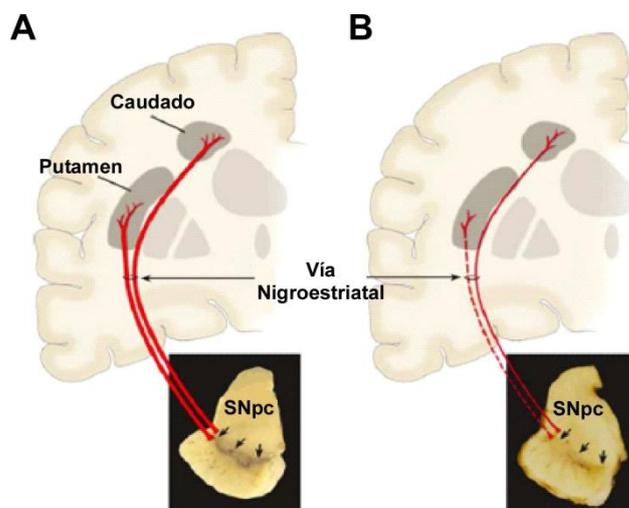
### 1.1. Fisiopatología

La enfermedad de Parkinson (EP), fue descrita inicialmente por James Parkinson en 1817 como “parálisis agitante”, la cual presenta una serie de síntomas motores característicos: temblor en reposo, bradicinesia, aquinesia y rigidez muscular. Dichos trastornos motores pueden ir acompañados de deficiencias cognitivas, así como de ansiedad, depresión y trastornos del sistema nervioso autónomo (Dawson y Dawson, 2003).

La EP se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) que proyectan al estriado (Figura 1). La pérdida de dichas neuronas da lugar a una disminución de los niveles de dopamina (DA) en el estriado, siendo del 60-80% cuando se manifiestan los primeros síntomas motores (German y col., 1983). No obstante, además de afectarse las neuronas dopaminérgicas en la EP, también se produce la muerte celular de otras poblaciones neuronales (Braak y col., 2003). Desde un punto de vista funcional, la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc produce un incremento en la actividad de los núcleos de salida de los ganglios basales (globo pálido externo/sustancia negra *reticulata*), lo que da lugar a una excesiva inhibición tálamo-cortical y de los sistemas motores del tronco del encéfalo (Obeso y col., 2002) y en consecuencia dificultad para iniciar los movimientos. Otra característica de la EP es la presencia de unos agregados proteicos denominados cuerpos de Lewy, compuestos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína en forma fibrilar (Spillantini y col., 1997) y ubiquitina entre otras proteínas (revisado en Shults, 2006). Estas inclusiones además de encontrarse en las neuronas dopaminérgicas, también están presentes en otras regiones cerebrales (Jellinger y col., 1999).

Dicha enfermedad es la segunda patología neurodegenerativa más común, con una prevalencia de 160 casos al año por cada 100000 habitantes en el Oeste de Europa, afectando al 4% de la población en torno a los 80 años (Davie, 2008). La mayor parte del parkinsonismo es de causa desconocida (Parkinson idiopático), aunque existen algunos casos que se deben a causas genéticas (Parkinson familiar). Estos eventos de parkinsonismo familiar surgen a partir de alteraciones de determinados genes, entre los que se han identificado principalmente el gen de la  $\alpha$ -sinucleína, parkina, LRKK2,

PINK1, UCHL-1, GBA y DJ-1 entre otros, los cuales están asociados a la enfermedad (Volta y col., 2015).



**Figura 1. Esquema de la vía nigroestriatal en condiciones normales y en la enfermedad de Parkinson.** A. Representación de la vía nigroestriatal (líneas rojas) en un individuo sano, la cual está constituida por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran localizados en la SNpc (ver flechas cortas). Estas neuronas proyectan (líneas rojas gruesas) hacia el núcleo estriado (putamen y caudado). En la imagen se puede apreciar la pigmentación normal de la SNpc. B. Representación de la vía nigroestriatal (líneas rojas) en un individuo parkinsoniano, la cual se ve afectada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Existe una mayor afectación de las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el putamen (línea roja punteada), y una modesta pérdida de aquellas que proyectan hacia el caudado (línea roja continua más fina). Se puede apreciar en la microfotografía la despigmentación característica de la SNpc debido a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (ver flechas; Dauer y Przedborski, 2003).

A pesar de las numerosas y exhaustivas investigaciones llevadas a cabo, la causa por la que se produce la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la EP aún se desconoce, aunque se ha propuesto que probablemente el origen de la mayoría de los casos de parkinsonismo idiopático pueden deberse a múltiples factores como la edad, aspectos genéticos y ambientales (Braak y Del Tredici, 2008; Wider y Wszolek, 2008; Collier y col., 2011). La combinación de estos factores puede que induzcan determinados mecanismos moleculares patogénicos implicados en la degeneración neuronal, entre los que se han identificado el estrés oxidativo debido al metabolismo de la DA, alteraciones en el procesamiento proteico, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína, y procesos apoptóticos (Dauer y Przedborski, 2003; Sulzer, 2007; Obeso y col., 2010). Recientes estudios muestran además que la neuroinflamación y en concreto la activación microglial podrían también

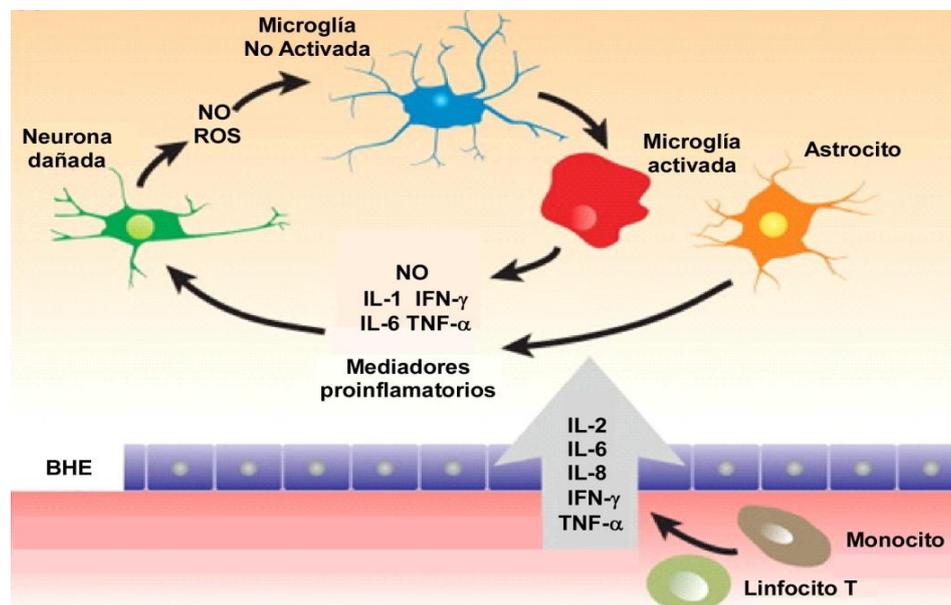
contribuir a la cascada de eventos que conducen a la aparición y desarrollo de la EP (revisado en Tansey y Goldberg, 2010; Hirsch y Hunot, 2009; Hirsch y col., 2012).

## **1.2. Neuroinflamación en la EP**

En base a datos epidemiológicos, neurogenéticos y estudios *post-mortem*, se ha propuesto que posiblemente los mecanismos neuroinflamatorios contribuyan en la degeneración neuronal de la EP. Entre estos mecanismos se encuentran la activación microglial, la astrogliosis y la infiltración linfocítica, siendo los dos primeros los que más ampliamente se han descrito (Braak y col., 2007; Hirsch y Hunot, 2009; Hirsch y col., 2012; McAllister y Van de Water, 2008; Obeso y col., 2010). Sin embargo, estos procesos no sólo están presentes en la EP, ya que se observan también en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la parálisis supranuclear progresiva (McGeer y col., 2004), por lo que es poco probable considerar que estos mecanismos sean la principal causa de la muerte celular en el parkinsonismo, aunque sí contribuyen al desarrollo de la misma.

Desde un punto de vista clásico, la neuroinflamación se ha considerado como el conjunto de procesos que se desencadenan en el cerebro con objeto de elaborar una respuesta frente a agresiones tales como un trauma o infección. Esta respuesta inflamatoria es local y se caracteriza por una activa comunicación entre las células presentes en el parénquima cerebral (neuronas, células microgliales y astrocitos), las células vasculares y las células del sistema inmune (monocitos, macrófagos y linfocitos T). Todas ellas pueden liberar mediadores inflamatorios tales como citoquinas, y especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés ``Reactive Oxygen Species´´), favoreciendo la eliminación/remodelación del tejido dañado. De este modo la neuroinflamación se considera un mecanismo protector con el que se limitan los posibles daños en el cerebro, destruyendo a las células afectadas y modificando la matriz extracelular (Streit, 2002; Correale y Villa, 2004; Bauer y col., 2007; Sofroniew, 2005; Sofroniew y Vinters, 2010). Sin las respuestas inflamatorias locales adecuadas el tejido cerebral sería vulnerable a traumas agudos, e infecciones microbianas o virales. No obstante, en determinadas condiciones patológicas como ocurre en la EP, donde el proceso neuroinflamatorio se cronifica, éste puede tener efectos deletéreos. En relación a este proceso y las células gliales podemos destacar principalmente dos fenómenos que

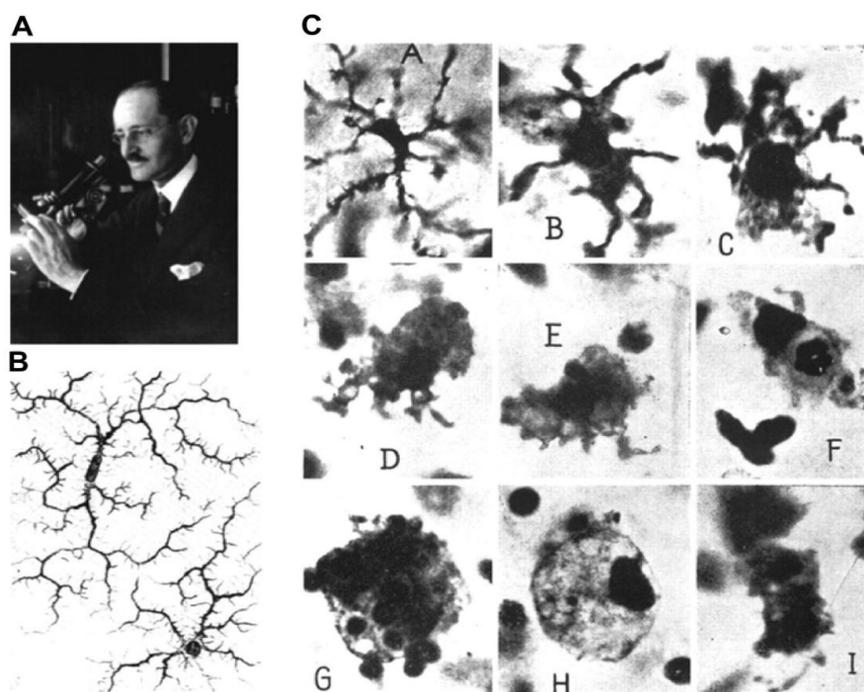
son los más ampliamente estudiados: la reacción microglial y la astrogliosis. En ambos tipos celulares durante determinadas situaciones patológicas tienen lugar mecanismos de activación denominados gliosis (Kreutzberg, 1996; O'Callaghan y Sriram, 2005; Glass y col., 2010). Morfológicamente la gliosis consiste en cambios macroscópicos en los fenotipos de las células gliales, traduciéndose principalmente en la activación y transformación de las células microgliales a células fagocíticas, y en menor medida de los astrocitos en reactivos (Narassimahan, 2005; Kettenmann, 2006 y 2007; Napoli y Neumann, 2009; Sofroniew y Vinters, 2010). Tras estos cambios se produce la liberación de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), con los que se favorece el estado de alerta y por tanto el consecuente daño neuronal. Además, esta liberación de factores inflamatorios altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que facilita la entrada al parénquima cerebral de linfocitos y células del sistema monocito/macrófago, los cuales a su vez también secretan más mediadores inflamatorios contribuyendo al mantenimiento del estado crónico de neuroinflamación (Figura 2; Hutter-Saunders y col., 2011; More y col., 2013; Nolan y col., 2013).



**Figura 2. Esquema del proceso neuroinflamatorio implicado en el daño neuronal.** Representación esquemática de los diferentes tipos celulares que intervienen en la neuroinflamación (astrocitos, microglía, células vasculares y linfocitarias), los cuales en situaciones patológicas como en la EP se mantienen en estado activado, gracias a la comunicación entre las mismas mediante la liberación de diferentes mediadores proinflamatorios como el óxido nítrico (NO), la interleuquina-1 y 6 (IL-1, IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que conlleva al correspondiente daño neuronal. (Modificado de Nolan y col., 2013).

### 1.2.1. Activación microglial

La microglía es un tipo celular del sistema nervioso central (SNC) con una morfología característica (Figura 3A; Del Río-Hortega, 1932; Kettenmann y col., 2011): soma pequeño y numerosas y largas prolongaciones que permanecen en estado quiescente durante largos periodos de tiempo (Figura 3B), y que tras un estímulo fisiológico o patológico se activan sufriendo un cambio morfológico, que se traduce en un aumento del tamaño del soma y en el acortamiento y engrosamiento de dichas prolongaciones (Cullheim y Thams, 2007). Existen diversos estadios de activación hasta llegar a conformar una morfología ameboide, semejante a la de los macrófagos tisulares (Figura 3C; Del Río-Hortega, 1932). Su función en el SNC es comprobar y alertar de cualquier situación nociva, en cuyo caso se activarán y producirán citoquinas y ROS, por medio de los cuales se comunicarán con otras células del cerebro (como los astrocitos) y células del sistema inmune. Por tanto, representan la principal línea de defensa del cerebro ante daños en el mismo. No obstante, cuando el estímulo que produce la neuroinflamación es mantenido en el tiempo como ocurre en la EP, ocasionan destrucción de tejidos y muerte neuronal (McGeer y col., 1993; Hanisch y Kettenmann, 2007).



**Figura 3. Diferentes estadios de activación de las células microgliales descritos por Del Río-Hortega.** A. Pío del Río-Hortega (1882-1945). B. Imágenes de la morfología característica de las células microgliales con las largas prolongaciones ramificadas dibujadas por Del Río-Hortega. C. Imágenes de los diferentes estadios de activación de la microglía en los que termina alcanzando una morfología ameboide (Del Río-Hortega, 1932; Modificado de Kettenmann y col., 2011).

Tanto en análisis *post-mortem* como en pacientes de EP, mediante estudios de neuroimagen, se ha descrito un aumento en el número de células microgliales activadas (McGeer y col., 1988; Gerhard y col., 2006). Por otro lado, también se ha mostrado el incremento de niveles de citoquinas proinflamatorias en el suero de pacientes, como el TNF- $\alpha$  (Mogi y col., 1994; Scalzo, 2009) y el IFN- $\gamma$  (Mount y col., 2007; Reale y col., 2009).

### **1.2.2. Activación astrogial**

El otro tipo glial descrito implicado en los procesos neurodegenerativos de la EP son los astrocitos. Éstos poseen cuerpos celulares pequeños con prolongaciones que se ramifican y extienden en todas direcciones, siendo característicos los extremos de estas ramificaciones conocidos como ``pies astrocitarios'', los cuales tapizan a los vasos sanguíneos presentes en el SNC, formando parte de la BHE. Los astrocitos proporcionan un marco de sostén a las neuronas, además de intervenir en la homeostasis del espacio extracelular controlando las concentraciones de iones (Sofroniew, 2005), también participan en la recaptación de los neurotransmisores glutamato y DA, y en el establecimiento y maduración de las sinapsis (He y Sun, 2007). Por otro lado, son sensibles a los cambios en el parénquima cerebral y llegan a activarse en presencia de estímulos inflamatorios, lo cual produce modificaciones morfológicas que se traducen en aumento del tamaño del cuerpo celular e incremento del número de ramificaciones. Además, se intensifican varias cascadas de señalización como las mediadas por ATP y citoquinas, resultando en la sobreexpresión de determinadas proteínas, entre ellas la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), comúnmente utilizada como marcador astrocitario. Al igual que ocurre en la activación microglial, también se ha observado un incremento en el número de astrocitos reactivos en cerebros de pacientes parkinsonianos analizados *post-mortem* (Forno, 1992; Braak y col., 2007).

### **1.2.3. Oligodendrogliosis**

Hallazgos recientes señalan otro tipo celular del SNC que pudiera estar implicado en procesos neuroinflamatorios: los oligodendrocitos (OLs; Annese y col., 2013). Éstos son un tipo glial constituido por cuerpos celulares muy pequeños y con algunas prolongaciones muy finas. Su función principal es formar la mielina de los axones neuronales del cerebro y de la médula espinal. Además son fundamentales para que se lleve a cabo una correcta función y señalización de las neuronas. Al igual que los

astrocitos y la microglía, los OLs y sus precursores son vulnerables a condiciones presentes en lesiones o patologías del SNC. La variedad de factores secretados durante la neuroinflamación afectan a este tipo glial, de modo que la morfología de los OLs cambia, aumentando el tamaño del cuerpo celular y presentando un mayor número de prolongaciones con un incremento en el grosor de las mismas. Estas modificaciones morfológicas constituyen el proceso de activación de los OLs denominado oligodendrogliosis, el cual ha sido descrito en varias enfermedades neurodegenerativas, siendo más desconocido el papel en la EP (McGeer y McGeer, 2008).

#### **1.2.4. Modelos animales de EP y Neuroinflamación**

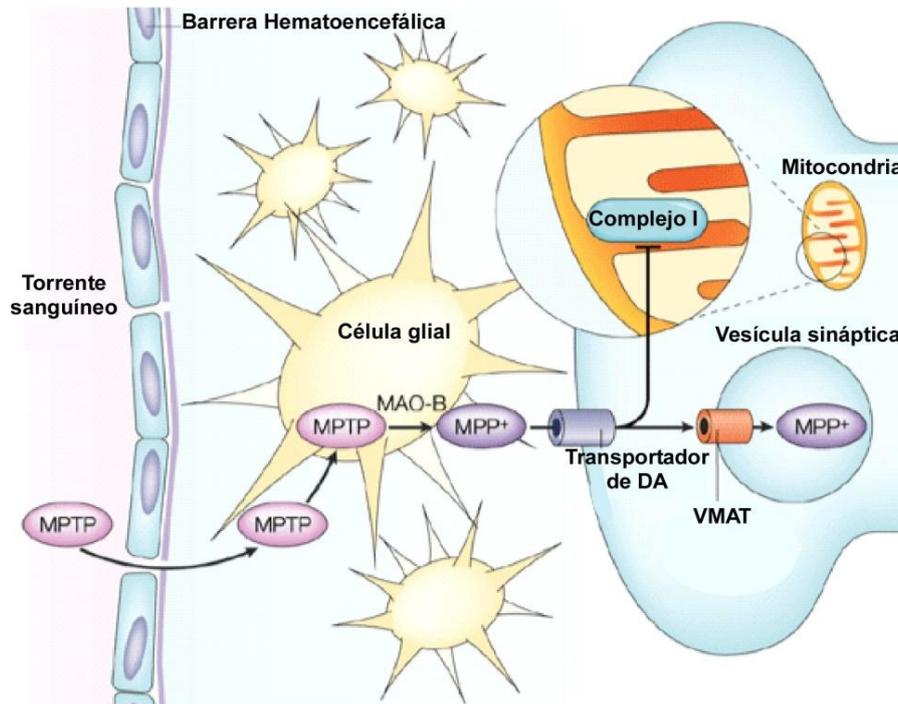
La mayor parte de los conocimientos que se tienen sobre los mecanismos fisiopatológicos de la EP se deben a estudios desarrollados en diferentes modelos animales de parkinsonismo, los cuales pueden ser genéticos o farmacológicos (Blandini y Armentero, 2012; Bové y Perier, 2012). Concretamente, los modelos farmacológicos o también denominados toxicológicos representan los modelos animales experimentales de parkinsonismo clásicos, y por ende más antiguos y ampliamente usados. Éstos se basan en el uso de toxinas, las cuales inducen la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, reproduciendo cambios neuropatológicos y sintomáticos de la EP humana.

Entre los diferentes modelos farmacológicos el mejor caracterizado es el basado en la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ya que la administración sistémica de la misma, produce una lesión bilateral reproducible de la vía dopaminérgica nigroestriatal, lo cual no ocurre en otros modelos farmacológicos (Bové y Perier, 2012). La neurotoxina MPTP, fue descubierta accidentalmente en 1982 cuando un grupo de jóvenes drogadictos tras consumir un opiáceo sintético contaminado con el MPTP desarrollaron parkinsonismo agudo (Langston y col., 1983). Esto propició la utilización de este tóxico en animales de laboratorio, principalmente ratones y primates, en los que se observó el desarrollo de un síndrome parkinsoniano asociado a la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, de modo que se extendió su uso con objeto de estudiar en profundidad la patogenia de la EP.

El metabolismo del MPTP es un proceso complejo y en el que intervienen varios pasos (Figura 4; Tipton y Singer, 1993; Dauer y Przedborski, 2003). Tras su administración sistémica, al ser altamente lipofílico rápidamente atraviesa la BHE. Una vez en el cerebro, el MPTP es captado por células gliales, probablemente astrocitos, y es

transformado en 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium (MPDP) por la acción de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B; Chiba y col., 1984; Heikkila y col., 1984; Langston y col., 1984; Markey y col., 1984). Posteriormente éste se oxida espontáneamente al metabolito activo tóxico 1-metil-4-fenilpiridínico (MPP<sup>+</sup>; Przedborski y Vila, 2003), el cual se libera al espacio extracelular. El MPP<sup>+</sup> al ser una molécula polar no puede entrar libremente en las células, por lo que depende de transportadores de membrana. Concretamente posee alta afinidad por el transportador de DA (DAT) presente en las neuronas dopaminérgicas y a través del cual pasan a su interior (Javitch y col., 1985). Una vez dentro de las neuronas dopaminérgicas, puede interactuar con diversas enzimas citosólicas o acumularse en la mitocondria (Adams y col., 1993; Klaidman y col., 1993; Ramsay y Singer, 1986). En la mitocondria el MPP<sup>+</sup> inhibe al complejo I de la cadena transportadora de electrones, disminuyendo los niveles de ATP (Nicklas y col., 1985; Ramsay y col., 1986) y aumentando la producción de radicales libres contribuyendo a generar estrés oxidativo (Blum y col., 2001; Tipton y Singer, 1993), y por tanto muerte celular. Por otro lado el MPP<sup>+</sup> se almacena en vesículas sinápticas tras unirse al transportador vesicular de monoaminas (VMAT; Del Zompo y col., 1993), reduciéndose así su efecto tóxico.

El MPTP no presenta la misma efectividad entre unas especies a otras, variando la susceptibilidad del mismo inclusive entre cepas de la misma especie, edad o el sexo de los individuos (Przedborski y col., 2001). Dicha neurotoxina es usada principalmente en primates y ratones, aunque su toxicidad también ha sido mostrada en otras especies como perros, gatos, ovejas, ratas y peces (Gerlach y Riederer, 1996; Przedborski y col., 2001). Sin embargo, debido a motivos científicos y económicos, el ratón es la especie más utilizada. Respecto a los anteriores factores descritos lo más común es utilizar ratones macho a partir de 8 semanas de edad, de la cepa C57BL/6, ya que es la que presenta mayor sensibilidad y especificidad al MPTP (Schmidt y Ferger, 2001).

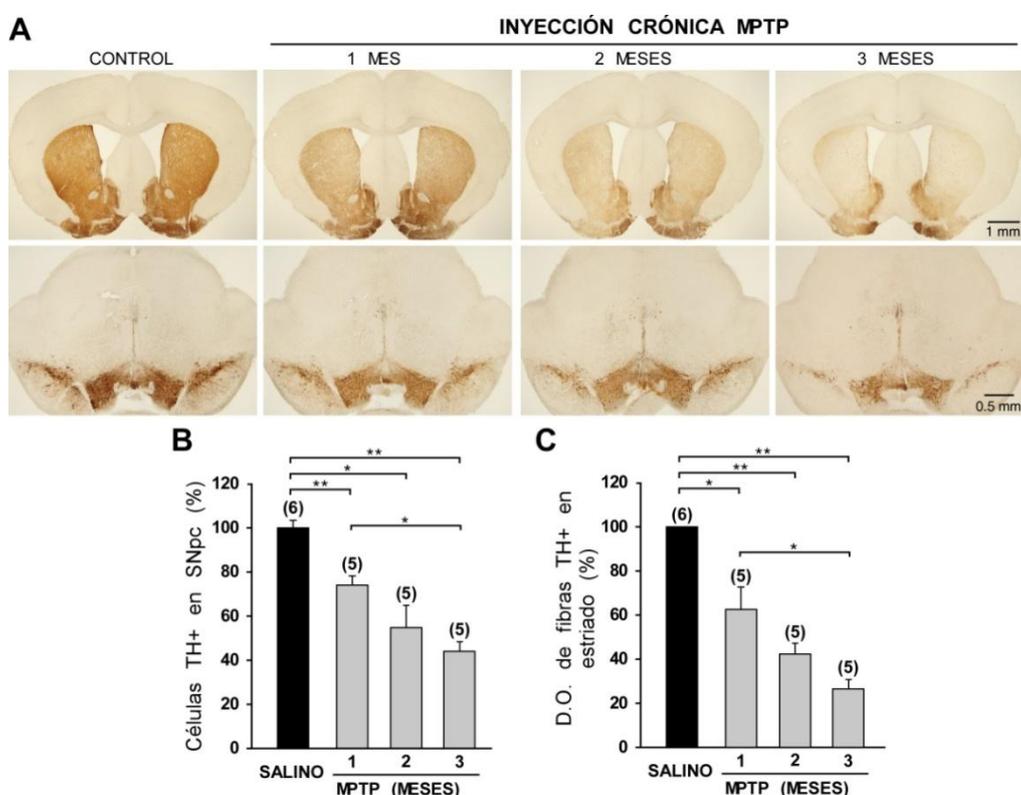


**Figura 4. Metabolismo del MPTP.** Representación del mecanismo de acción en el cerebro de la neurotoxina MPTP. Para explicación ver texto (Przedborski y Vila, 2003).

El modelo convencional de MPTP implica la administración aguda o subaguda de la neurotoxina, requiriendo altas dosis de neurotóxico en periodos cortos de tiempo. La forma más común y reproducible de administración es mediante inyección sistémica (Przedborski y col., 2001). En estos modelos agudos cuando el MPTP es administrado sistémicamente en el ratón se produce una degeneración selectiva de la vía nigroestriatal junto con ciertas alteraciones motoras que se asemejan a la EP en humanos (Sedelis y col., 2001), sin embargo el tóxico induce una muerte celular rápida a diferencia de la lenta progresión de la enfermedad. Además, la lesión dopaminérgica inducida por administración aguda del MPTP presenta alta variabilidad incluyendo un elevado grado de reversibilidad del daño dopaminérgico al retirar la administración de MPTP tras escasas dosis (Petroske y col., 2001; revisado en Meredith y col., 2008). Durante los últimos años, diferentes autores han propuesto modelos de parkinsonismo crónico mediante la aplicación de nuevos protocolos de MPTP en los que administran bajas dosis de neurotóxico durante largos periodos de tiempo (2-5 semanas) con la intención de conseguir una lenta progresión de la degeneración dopaminérgica, además de poder reproducir la presencia de inclusiones neurales (Rozas y col., 1998; Petroske y col., 2001; Shimoji y col., 2005; Fornai y col., 2005; Alvarez-Fischer y col., 2008; Gibrat y col., 2009). Sin embargo, existen grandes discrepancias entre los diferentes tratamientos

crónicos de MPTP respecto al nivel de degeneración nigroestriatal, la reacción neuroinflamatoria, la aparición de síntomas motores y la formación de inclusiones proteicas. Además, estos modelos crónicos de MPTP no son capaces de mostrar una clara degeneración progresiva de las neuronas nigroestriatales, ni de reproducir los diferentes estadios de la enfermedad.

Debido a los principales inconvenientes descritos sobre los diferentes modelos de MPTP, en el laboratorio se desarrolló un nuevo modelo crónico de parkinsonismo, en el que se administran dosis bajas de MPTP (20mg/Kg MPTP 3 veces por semana) durante 3 meses en ratones de la cepa C57BL/6, obteniéndose una robusta destrucción progresiva y bilateral de la vía nigroestriatal a lo largo del periodo de tratamiento con el neurotóxico (Figura 5; Muñoz-Manchado y col., 2016).



**Figura 5. Lesión de la vía nigroestriatal en el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP.** A. Inmunohistoquímica TH de la innervación dopaminérgica del estriado (arriba) y las células TH<sup>+</sup> de la SNpc (abajo) de ratones representativos tratados con salino (control) o MPTP 20 mg/kg, 3 veces por semana durante 1, 2 ó 3 meses. B. Cuantificación estereológica de las células TH<sup>+</sup> de la SNpc en los 4 grupos de animales. C. Densitometría óptica (D.O.) de la innervación estriatal TH<sup>+</sup> en los 4 grupos de animales. Entre paréntesis el número de animales, \* p<0,05; \*\* p<0,01.

La degeneración inducida en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc va acompañada de alteraciones motoras y déficits en la coordinación. De modo que este nuevo modelo

de parkinsonismo crónico, basado en la continua administración a bajas dosis de MPTP durante un largo periodo de tiempo, consigue mimetizar de una forma robusta la degeneración dopaminérgica lenta y progresiva característica de la EP. Además, este tratamiento tiene una gran utilidad a la hora de estudiar diferentes estadios de la enfermedad, basado en el nivel de degeneración dopaminérgica, y así tener un mejor conocimiento de la patofisiología de la misma.

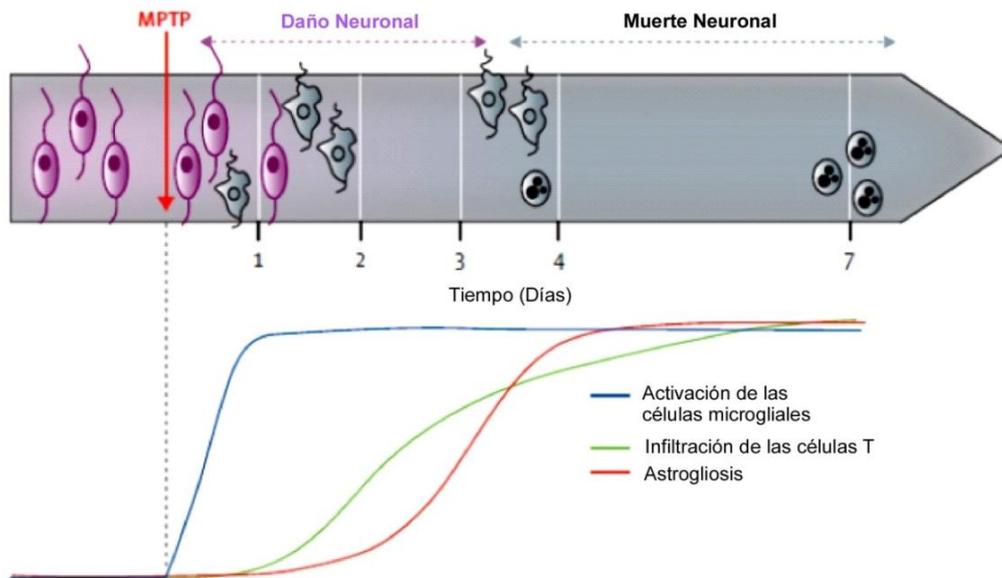
Como se ha descrito con anterioridad uno de los aspectos más importantes en la patofisiología de la EP, es la notoria reacción glial existente, la cual también se ha observado en varios modelos animales de parkinsonismo (Hirsch y Hunot, 2009). Los mecanismos responsables del mantenimiento de la activación glial en el cerebro se desconocen, no obstante las citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  podrían ser posibles candidatos (Tedeschi y col., 1986; Benveniste y col., 1994; Hanisch, 2002). De hecho, el bloqueo selectivo de la actividad del TNF- $\alpha$  protege frente a la pérdida neuronal dopaminérgica. En el mismo sentido, ratones mutantes del receptor TNF- $\alpha$  se muestran una menor degeneración de la SNpc tras el tratamiento con MPTP (Sriram y col., 2002 y 2006; Ferger y col., 2004; McCoy y col., 2006). También ratones knockout para el IFN- $\gamma$  son menos susceptibles a la pérdida neuronal ocasionada por dicha neurotoxina (Mount y col., 2007).

Por otro lado, e la activación microglial ha sido descrita tras la administración de la neurotoxina MPTP en cerebros de ratones (Liberatore y col., 1999; Annese y col., 2013) y monos (Hurley y col., 2003; Barcia y col., 2004; Annese y col., 2013). Sin embargo, esta activación parece variar según el método de exposición al neurotóxico, ya que se observa una clara activación microglial tras administraciones agudas de MPTP. No obstante, existen importantes diferencias entre distintos estudios en la detección de la activación microglial en modelos crónicos (Furuya y col., 2004; Hirsch y Hunot, 2009). En general, la activación microglial es una característica común presente en todos los modelos agudos de parkinsonismo experimental, sugiriendo un posible papel en el proceso de degeneración neuronal. Esto se apoya en estudios que muestran que la activación microglial precede la muerte neuronal dopaminérgica (Figura 6; Liberatore y col., 1999; Breidert y col., 2002; Hirsch y Hunot, 2009), y por tanto la inhibición de este evento pudiese evitar la muerte de dichas neuronas (Wu y col., 2002).

También la astrogliosis se ha reproducido en modelos animales de parkinsonismo, observándose una elevada inmunoreactividad de GFAP a nivel de la SNpc y del estriado

en ratas expuestas a la 6-Hidroxi-dopamina (6-OHDA; Rodrigues y col., 2001), y en ratones tratados con MPTP (Bredert y col., 2002). Dicha inmunoreactividad también se ha descrito en otras enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer (Diedrich y col., 1987), Huntington (Galatioto, 1996), y esclerosis múltiple (Darvesh y col., 2010), sugiriendo la implicación de los astrocitos en los procesos neuroinflamatorios que intervienen en la degeneración neuronal (Barcia y col., 2013).

Ambos fenómenos de neuroinflamación, microgliosis y astrogliosis, se ha mostrado que ocurren tanto en la SNpc y como en el estriado de ratones tratados con MPTP, sucediéndose en distintos tiempos durante el proceso neuroinflamatorio. De modo que se observa una notable activación microglial a los 2 días tras la administración del MPTP, mientras que el pico máximo de reacción astrogliosa se registra a los 5 días tras la administración de la neurotoxina (Figura 6; Bredert y col., 2002). Estos dos tipos celulares se diferencian en la actividad proliferativa, ya que se identificaron nuevas células microgliales mediante el marcador de proliferación 5'-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en ratones y monos tratados con MPTP, no observándose este marcaje en las células astrogliales positivas para GFAP (Tandé y col., 2006). Por consiguiente, la activación microglial implica un aumento de la cantidad de las células microgliales además de las modificaciones morfológicas que experimentan las mismas, mientras que la astrogliosis sólo se caracteriza por presentar cambios fenotípicos (incremento en la expresión de GFAP y cambios morfológicos de los astrocitos). No obstante, el papel que desarrollan los astrocitos en la EP no es del todo conocido, aunque se podría hipotetizar que es improbable que participen en los primeros eventos que conducen a la muerte neuronal dopaminérgica, ya que la reacción astrogliosa tiene lugar más tarde en el proceso degenerativo.



**Figura 6. Secuencia de los eventos celulares ocurridos en la SNpc tras la administración aguda de la neurotoxina MPTP (15mg/kg en intervalos de 2 horas/día a lo largo de 1 semana) en ratón.** Una vez suministrado el MPTP tiene lugar el daño neuronal dopaminérgico. Esta fase lesiva puede durar unos 3-4 días y pasado este periodo, se produce la destrucción y eliminación de las neuronas afectadas. 7 días después de la administración de la toxina, la muerte celular dopaminérgica no progresa más. Durante este curso temporal, las células microgliales se activan rápidamente (12-24h tras la administración del MPTP), siendo éstas muy sensibles a leves cambios neuropatológicos. La reacción de la astrogliosis ocurre después, 3-4 días tras la administración del MPTP, concomitantemente con la muerte celular dopaminérgica. La infiltración de los linfocitos T en el cerebro sucede a los 2 días de administrar MPTP, y se incrementa de forma continuada durante los siguientes 5 días. La reacción inflamatoria generada por la activación de la microglía en la SNpc puede que contribuya al reclutamiento específico de estas células del sistema inmune adaptativo (Modificado Hirsch y Hunot, 2009).

Posteriormente, se ha mostrado la implicación de un tercer tipo glial en la afectación de las neuronas dopaminérgicas y de sus proyecciones en el estriado debidas al tratamiento de MPTP en ratones y macacos, observándose una importante oligodendrogliosis en toda la vía nigroestriatal. Esto pone de manifiesto el posible papel de los OLs en el parkinsonismo, aunque los mecanismos y funciones de los mismos en modelos experimentales y en pacientes aún se desconocen (Takagi y col., 2007; Annese y col., 2013).

Todos los datos obtenidos hasta ahora, tanto de los análisis *post-mortem* como de los pacientes, junto con los estudios en los modelos animales de parkinsonismo, sugieren que el mecanismo de muerte celular en la vía nigroestriatal está relacionado con distintos tipos de células no neuronales: microglía, astrocitos, oligodendrocitos, además de células del sistema inmune periférico, siendo la activación microglial y la astrogliosis los procesos más estudiados.

### **1.3. Tratamiento de la EP**

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la principal característica de la EP es la pérdida progresiva de DA en el estriado, lo cual llevó en primer lugar al desarrollo de terapias farmacológicas que trataran de suplir el déficit dopaminérgico. El principal tratamiento de elección para la enfermedad es la levodopa, un precursor inmediato de la DA, que es administrado por vía oral siendo capaz de atravesar la BHE (a diferencia de la DA), y que mediante la enzima l-aminoácido descarboxilasa es transformada en DA. Éste fármaco es el método terapéutico más ampliamente utilizado, no obstante a largo plazo su uso plantea efectos secundarios. Un alto porcentaje de los pacientes tratados con levodopa durante un periodo prolongado (más de 5 años) desarrollan complicaciones motoras como disquinesias o alteraciones motoras, posiblemente debido administración oral de levodopa supone un aporte intermitente de DA que no reproduce el patrón fisiológico de secreción del neurotransmisor.

Posteriormente se utilizó la combinación de la levodopa junto con otros fármacos como inhibidores de la descarboxilación periférica (carbidopa o benserazide), con objeto de aumentar su vida media en sangre y así reducir los efectos adversos periféricos de la DA, como náuseas, vómitos e hipotensión arterial. Más tarde, se emplearon inhibidores de dos enzimas de la ruta de degradación de la DA, la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoamino oxidasa B (MAO-B; para revisión ver Schapira, 2009), con los que se potencia el efecto de la levodopa. Otros fármacos utilizados son los agonistas dopaminérgicos, que retrasan las complicaciones a largo plazo aunque presentan una menor eficacia que la levodopa. No obstante, aunque estos tratamientos contribuyan en la mejora de la sintomatología de la enfermedad, sobre todo en los primeros estadios, a largo plazo se observa una pérdida de eficacia de los mismos, además de aparecer distintos efectos secundarios, lo cual supone uno de los principales inconvenientes de la terapia farmacológica (Wijeyekoon y Barker, 2009).

Recientemente se han desarrollado distintos tratamientos quirúrgicos de la EP, que producen una importante mejora de los síntomas motores. (Blomstedt y Hariz, 2006). No obstante, dichas terapias también presentan ciertas desventajas como el alto coste del procedimiento o el riesgo de sufrir infecciones (revisado en Moro y Lang, 2006).

Las limitaciones que exhiben todos los tratamientos actuales para la EP, promueven la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan luchar más eficazmente contra la enfermedad, con objeto de reparar o restaurar la función dopaminérgica de la vía

nigroestriatal dañada (Wijeyekoon y Barker, 2009; Bjorklund y Kordower, 2010; Rangasamy y col., 2010; Dunnett y Rosser, 2011; Bjorklund y Kordower, 2013). En este sentido, la terapia celular podría ser un posible tratamiento eficaz en el parkinsonismo, la cual, en la mayoría de los abordajes utilizados hasta la fecha, plantea restaurar los niveles de DA mediante el trasplante de células productoras de dicho neurotransmisor.

## **2. Terapia celular en la enfermedad de Parkinson**

Durante las últimas décadas el uso de trasplantes intraestriatales de células está siendo investigado intensamente, con los que se pretende reemplazar a las células dopaminérgicas dañadas por otras que restablezcan los niveles de DA, y por tanto compensar las alteraciones motoras presentes en esta enfermedad (Yurek y Sladek, 1990; Bjorklund y col., 2003). Se ha ensayado el trasplante de distintos tipos celulares en la EP, predominando el uso de células productoras de DA, dentro de las cuales cabe destacar a las células mesencefálicas fetales ya que son las que mejores resultados clínicos proporcionaron en un principio. Estudios en modelos animales de parkinsonismo mostraron que las células mesencefálicas fetales humanas trasplantadas en el estriado, producían DA y mejoraban la sintomatología motora característica de la EP (Perlow y col., 1979; Redmond y col., 1986). Esto propició la puesta en marcha de varios ensayos clínicos, los cuales reflejaban una óptima recuperación de los pacientes parkinsonianos trasplantados, observándose una importante reinervación estriatal (Freed y col., 1992; Lindvall y col., 1990 y 1992; Freeman y col., 1995, Piccini y col., 1999). Sin embargo, en dos estudios a doble ciego posteriores sólo se obtuvo una leve mejoría, presentando entre el 15-57% de los pacientes trasplantados alteraciones motoras (Freed y col., 2001; Olanow y col., 2003). Esta variabilidad de los ensayos clínicos se ha atribuido a la utilización de los diferentes métodos empleados para preparar el tejido a trasplantar, a la hora de seleccionar a los pacientes, e incluso en el tiempo en el que se evaluó la recuperación (Dunnett y col., 2001; Lindvall y Björklund, 2004). Asimismo, la aparición de movimientos involuntarios (discinesias) en los pacientes trasplantados y los problemas éticos que conlleva el uso de células fetales, cuestionan la aplicabilidad de estos trasplantes en la EP (Revisado en Arenas, 2010).

Por otro lado y debido a la baja disponibilidad de las células mesencefálicas fetales humanas, también se ha ensayado el trasplante de células mesencefálicas fetales

porcinas, cuyo uso no plantea dilemas éticos. No obstante, este tipo celular presenta inconvenientes como el rechazo inmunológico (Larsson y col., 2001; Armstrong y col., 2001) y la posible fuente de infecciones interespecies. Ensayos clínicos en pacientes muestran sólo un leve beneficio (Fink y col., 2000), sin embargo en un posterior estudio a doble ciego se observó que tanto los pacientes trasplantados como los del grupo placebo mostraban similares mejorías, por lo que hasta el momento no se han realizado más estudios (observación no publicada, referenciada en Olanow, 2009).

Además de la terapia celular basada fundamentalmente en el aporte de dopamina, en los últimos años se ha propuesto el trasplante de células que liberen factores neurotróficos, terapia celular neurotrófica, los cuales promueven la supervivencia de las neuronas aún no afectadas por el curso de la enfermedad, además de protegerlas ante determinadas situaciones patológicas como la muerte por apoptosis y la acción de diferentes tóxicos (Rangasamy y col, 2010). Dentro de dicha terapia celular neurotrófica se engloban los trasplantes de cuerpo carotídeo (CC), que además del posible aporte dopaminérgico, destacan por la alta producción de factores neurotróficos.

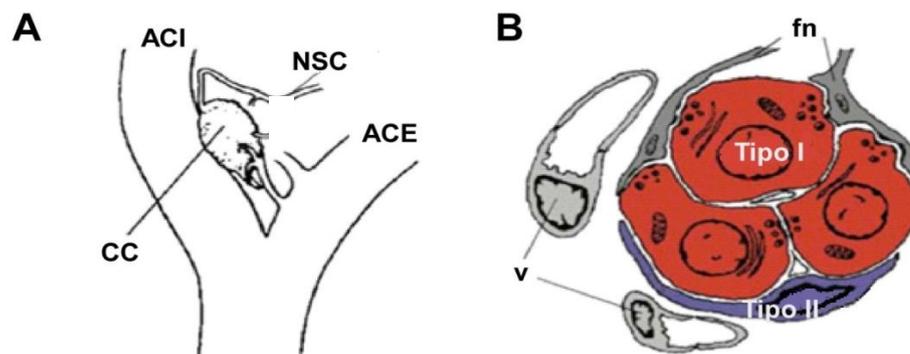
## **2.1. Trasplante de agregados celulares de cuerpo carotídeo**

Desde hace años en nuestro laboratorio se estudian diferentes aspectos de la fisiología del CC (ver revisión López-Barneo y col., 2008), considerándolo como una fuente de células productoras de DA para la realización de autotrasplantes en la EP. Esto es debido principalmente a que el CC es uno de los órganos más dopaminérgicos del organismo.

El CC se encuentra localizado bilateralmente en la bifurcación de la arteria carótida (Figura 7A), siendo el principal quimiorreceptor periférico en mamíferos, capaz de detectar los niveles de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y pH en sangre arterial e informar al SNC, donde se ponen en marcha las correspondientes respuestas compensatorias (López-Barneo y col., 2001 y 2003). Este órgano está altamente irrigado e innervado por fibras nerviosas aferentes que forman parte del nervio glosofaríngeo (Fidone y González, 1986). El parénquima del CC está constituido por células que se disponen formando glomérulos, los cuales contienen dos tipos celulares: las células glómicas y las células sustentaculares (Figura 7B). Las células glómicas o tipo I (con fenotipo neural), son los elementos quimiosensores y neurosecretores del CC. Estas células son altamente dopaminérgicas, pudiendo ser identificadas mediante inmunohistoquímica con

anticuerpos anti-tiroxina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas. Rodeando a las células glómicas se encuentran células más pequeñas y alargadas, conocidas como sustentaculares o tipo II, siendo TH negativas, y caracterizadas por expresar marcadores gliales como el GFAP, S-100 y vimentina. Recientemente se ha descrito que algunas células tipo II poseen características de células madre y por tanto son las responsables de la neurogénesis en el CC adulto de mamíferos (Pardal y col., 2007).

Otra propiedad del CC es que posee una elevada supervivencia en hipoxia (situación existente en el parénquima cerebral especialmente tras el implante). En concreto, este ambiente hipóxico es detectado por las células glómicas del CC e induce una serie de cambios morfológicos y neuroquímicos produciendo hipertrofia e hiperplasia en el mismo (McGregor y col., 1984; Stea y col., 1995), estimulando la expresión de la TH (Czyzyk-Krzeska y col., 1992) y la secreción de DA (López-Barneo y col., 1988; Urena y col., 1994).



**Figura 7. Localización y organización anatómica del cuerpo carotídeo.** A. Representación esquemática de la localización del cuerpo carotídeo (CC), también se muestran la arteria carótida interna (ACI) y externa (ACE), y el nervio del seno carotídeo (NSC). B. Representación esquemática de los tipos celulares que conforman el CC (tipo I y tipo II), vasos sanguíneos (v) y fibras nerviosas aferentes (fn). Modificada de Pardal y col., 2007.

Debido a dichas características, se propuso inicialmente el uso del trasplante de CC en modelos animales de parkinsonismo como una terapia sustitutiva de DA. Primeros implantes carotídeos en el estriado de ratas hemiparkinsonianas lesionadas con 6-OHDA, no producían un efecto claro de mejora, debido probablemente a que la dispersión de las células glómicas no permitía conservar la estructura glomerular del CC, posiblemente necesaria para la supervivencia y mantenimiento del implante (Hansen y col., 1988). No obstante, posteriores ensayos de trasplantes intraestriatales de agregados celulares de CC, en los que sí se conservaba la estructura glomerular, en ratas y monos hemiparkinsonianos tratados con MPTP exhibían una mejoría tanto en los

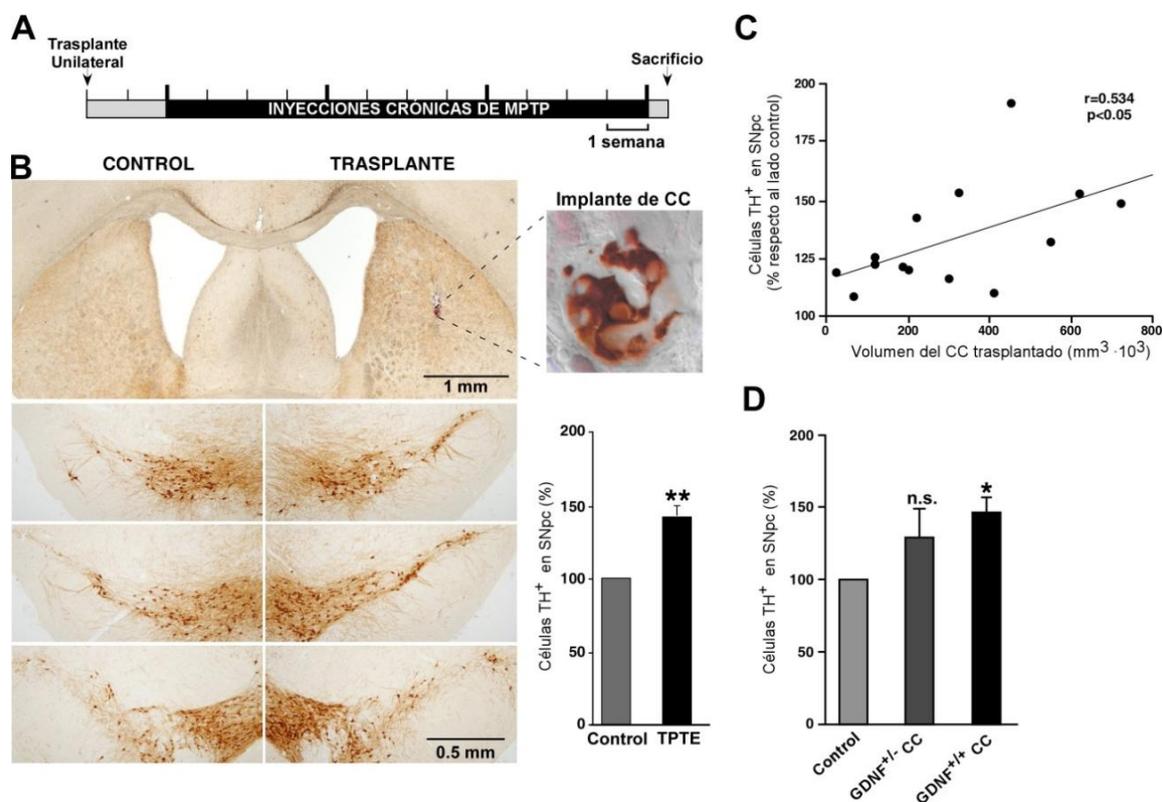
aspectos conductuales como histológicos y funcionales (Espejo y col., 1998; Luquin y col., 1999; Toledo-Aral y col., 2002 y 2003). Además de mostrar esta recuperación inducida por el implante carotídeo, en estos estudios se quiso profundizar en los mecanismos subyacentes de la misma, observando en el estriado trasplantado de ratas hemiparkinsonianas claros signos de reinervación, con una alta densidad de fibras estriatales inmunoreactivas para TH (Toledo-Aral y col., 2003). Del mismo modo, en monos con parkinsonismo crónico inducido por MPTP, el autotrasplante de agregados celulares de CC produce recuperación funcional mediante la reinervación dopaminérgica del núcleo caudado y el putamen (Luquin y col., 1999). Estos resultados pusieron de manifiesto que la recuperación observada en los animales parkinsonianos se debe, más que a la posible liberación local de DA, a que el implante carotídeo produce una acción trófica sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, favoreciendo la reinervación del estriado y la recuperación de los síntomas motores en los animales trasplantados (Toledo-Aral y col., 2003).

La acción trófica de los trasplantes de tejido carotídeo, sugerida en estos experimentos, se debe al hecho de que las células glómicas del CC de roedores adultos producen altas cantidades del factor dopaminotrófico GDNF (del inglés, "Glial cell-derived neurotrophic factor"; Toledo-Aral y col., 2003; Leitner y col., 2005) tanto *in situ* como trasplantado (Villadiego y col., 2005). Dicho factor se ha mostrado que ejerce una recuperación (Tomac y col., 1995; Gash y col., 1996; Björklund y col., 1997; Rosenblad y col., 1998; Kordower y col., 2000; Kirik y col., 2004) de similares características a las descritas en los animales trasplantados con CC (Akerud y col., 2001). Por tanto, puede considerarse a las células glómicas del CC como bombas biológicas duraderas y estables de GDNF, lo cual permite plantear su uso en terapia celular contra la EP.

Tal y como se ha descrito con anterioridad, las primeras evidencias que mostraban la acción trófica sobre la vía nigroestriatal ejercida por el CC trasplantado se obtienen a partir de ratas hemiparkinsonianas (Toledo-Aral y col., 2003), las cuales conforman un modelo animal que presenta importantes limitaciones para identificar y estudiar dicho efecto trófico. Por un lado, la falta de un control interno impide poder normalizar la variabilidad de la lesión. Por otro lado, la lesión aguda producida puede enmascarar los efectos protectores lentos y progresivos del trasplante en la vía nigroestriatal. Finalmente, el daño ejercido en la vía nigroestriatal no es uniforme. Todo ello y con objeto de estudiar si los trasplantes de CC protegen tróficamente dicha vía nigroestriatal, propició el uso del modelo murino desarrollado en nuestro laboratorio de

parkinsonismo crónico inducido por MPTP (Muñoz-Manchado y col., 2016). Este modelo se caracteriza por producir una lesión lenta, progresiva y sistémica dopaminérgica, mostrando de forma robusta el efecto beneficioso de los trasplantes de CC teniendo siempre el hemisferio contralateral no trasplantado como un potente control interno. Con este procedimiento experimental se observó que al trasplantar CC en un hemisferio, se protege la sustancia negra ipsilateral del daño crónico inducido por MPTP (Figura 8B). Además se inyectaron microesferas de látex con un marcador fluorescente (Lumaflúor) junto con el implante, de modo que se identificaron retrógradamente a las neuronas de la sustancia negra que han estado en contacto con el trasplante de CC, comprobando que éstas son precisamente las que se protegen del tratamiento crónico con MPTP. Por otro lado se advirtió, en consonancia con un efecto trófico clásico, que la protección trófica ejercida por el CC en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc mostraba una dependencia respecto a la cantidad de tejido carotídeo trasplantado, de modo que cuanto mayor era el volumen del CC implantado mayor era el número de células TH<sup>+</sup> protegidas en la SNpc (Figura 8C). Esta acción trófica dosis-dependiente de los trasplantes de CC fue además analizada en ratones heterocigotos GDNF/LacZ (GDNF<sup>+/-</sup>), los cuales se caracterizan por tener menores cantidades del factor neurotrófico GDNF. De este modo, se observa una menor protección en las neuronas de la SNpc en el lado trasplantado con CC de los ratones heterocigotos respecto a los ratones silvestres, en los cuales el trasplante de CC ejerce una protección notable y significativa de las neuronas dopaminérgicas (Figura 8D). Todos estos resultados confirman la acción beneficiosa ejercida por el CC trasplantado, el cual induce una acción trófica en la vía nigroestriatal, y que se correlaciona positivamente con el tamaño y nivel de expresión del factor neurotrófico GDNF del propio tejido carotídeo implantado.

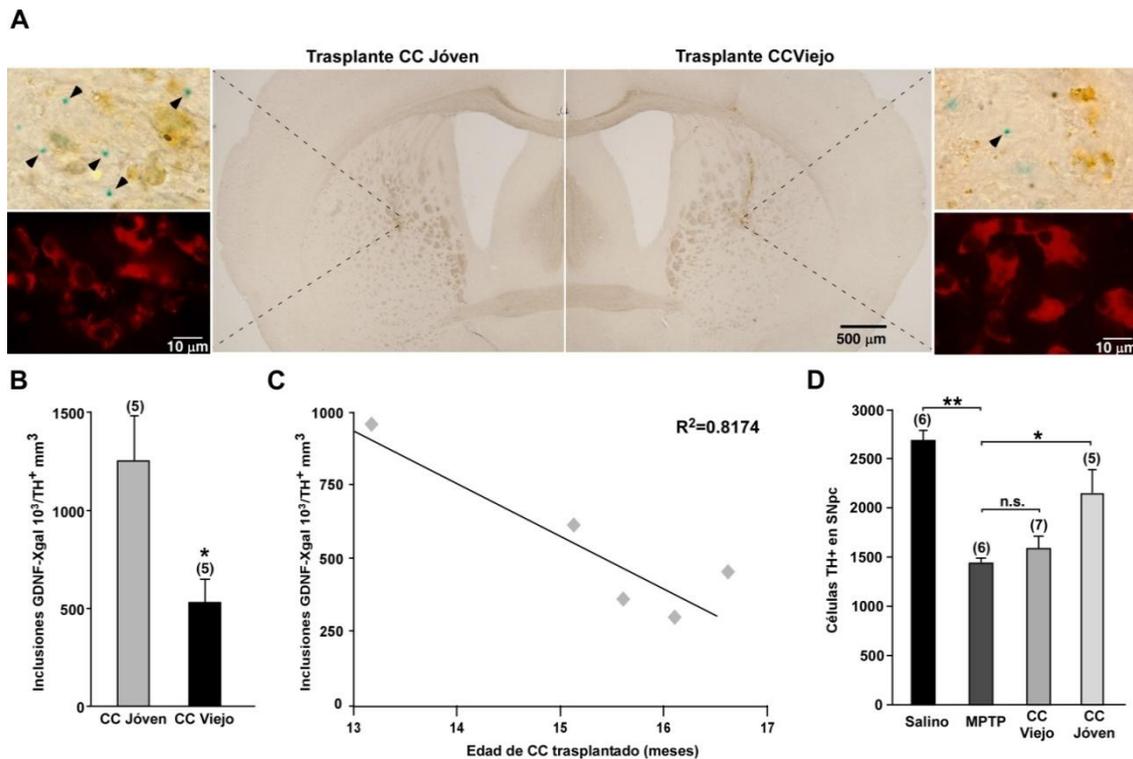
La significativa mejora inducida por los trasplantes de CC en los diferentes modelos animales de parkinsonismo, también propició evaluar la eficacia del trasplante de CC en pacientes con EP. Para ello, se realizaron dos ensayos clínicos con el fin de comprobar la factibilidad del autotrasplante de células del CC en humanos con EP (Arjona y col., 2003; Mínguez y col., 2007). En estos estudios sólo se observó en algunos de los pacientes trasplantados una leve mejoría tanto a nivel clínico como neuroquímico, sin llegar a obtener los resultados positivos conseguidos en la experimentación animal. Dentro de los factores que limitaban la eficacia terapéutica del autotrasplante se identificó la edad del paciente autotrasplantado (Arjona y col., 2003).



**Figura 8. Efecto de los trasplantes intraestriatales de CC sobre la SN en el modelo animal crónico de parkinsonismo.** A. Esquema del protocolo usado para estudiar el efecto de los trasplantes de CC sobre la vía nigroestriatal en un modelo crónico de MPTP. Se indican los momentos del trasplante y sacrificio, así como el periodo con MPTP. B. Inmunohistoquímica para TH en secciones coronales de cerebro mostrando la protección ejercida por el CC trasplantado (a mayor aumento en el recuadro de la derecha) en la vía nigroestriatal. Nótese la cuantificación estereológica, expresada como porcentaje respecto al lado control, situado a la derecha de las microfotografías de la SNpc. C. Gráfico de la regresión lineal ( $r=0,534$ ) establecido entre la protección inducida por el trasplante de CC y el volumen del mismo. D. Cuantificación estereológica de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en los ratones trasplantados con CC GDNF $^{+/-}$  o GDNF $^{+/+}$ . El CC GDNF $^{+/-}$  implantado muestra una protección reducida y no significativa (n.s.) comparada con el CC GDNF $^{+/+}$ , el cual induce una notable protección de las neuronas dopaminérgicas. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; Muñoz-Manchado y col., 2016.

En el laboratorio se han realizado diversos experimentos para estudiar el efecto de la edad en la acción neurotrófica producida por el implante de CC. En primer lugar se analizó la regulación de la expresión de GDNF en el CC ante una exposición prolongada de niveles bajos de oxígeno (10% O<sub>2</sub>) con objeto de mimetizar las condiciones en las que el CC se encuentra en el parénquima cerebral al ser trasplantado (Erecinska y Silver, 2001). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de GDNF en el CC de animales viejos en hipoxia crónica disminuía respecto al CC de animales jóvenes (Tesis doctoral Villadiego, 2007). En base a estos trabajos previos, se realizó un estudio comparativo de la expresión de GDNF en el CC viejo y joven de ratones heterocigotos GDNF/lacZ donantes una vez trasplantado. Los datos indicaron

una disminución de la expresión de GDNF en el trasplante de CC viejo respecto al trasplante de tejido carotídeo joven, no hallándose diferencias en el volumen del trasplante entre ambos casos (Figura 9B). Además se se mostró la correlación negativa existente entre la expresión de GDNF y la edad del CC trasplantado (Figura 9C). Estos resultados podrían explicar la disminución de la eficacia del implante en pacientes con edad avanzada (Figura 9; Modificado Tesis doctoral Muñoz-Manchado, 2011).



**Figura 9. Expresión de GDNF en el CC de donante joven y viejo trasplantado en ratones jóvenes.**

A. Cortes a nivel del estriado de un animal trasplantado con CC de ratones heterocigotos GDNF-LACZ jóvenes (izquierda) y viejos (derecha). La tinción Xgal de dichos cortes mostró las inclusiones GDNF-Xgal en los CC trasplantados joven y viejo (microfotografías izquierda y derecha en los extremos respectivamente), y mediante inmunofluorescencia de TH (en rojo) se midió el parénquima del implante de CC. B. El número de inclusiones GDNF-Xgal/mm<sup>3</sup> de los CC trasplantados fue menor en los CC viejos. En C se muestra la correlación inversa entre la edad del cuerpo carotídeo viejo trasplantado y la densidad de inclusiones GDNF-Xgal en el modelo crónico de MPTP. D. Cuantificación de las células TH<sup>+</sup> en la SNpc de animales salinos, tratados con MPTP y heterocigotos trasplantados con CC joven y viejo. Entre paréntesis se indica el número de experimentos. n.s.= no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01. Modificado tesis Muñoz-Manchado, 2011.

Los experimentos anteriormente descritos mostrando que la expresión del factor neurotrófico GDNF se ve afectada por la edad del CC implantado, aportan una explicación a la disminución de la eficacia terapéutica del autotrasplante de CC observada en los pacientes parkinsonianos de avanzada edad (Arjona y col., 2003). Por otro lado, una limitación adicional de los trasplantes de CC es la poca disponibilidad de

tejido, ya que el CC humano es un órgano muy pequeño. Esto ha hecho que en proyectos paralelos del grupo de investigación se haya analizado la expansión in vitro del CC (mediante la generación de neuroesferas) y así disponer de mayor biomasa para su uso en terapia celular (Pardal y col., 2007; López-Barneo y col., 2009). Por tanto resultaba necesario establecer un protocolo de inmunosupresión que posibilite analizar el efecto de los xenotrasplantes de CC de rata en nuestro modelo murino de parkinsonismo crónico inducido por MPTP, como paso previo a analizar el efecto terapéutico de alotrasplantes de CC humano procedentes de donantes jóvenes o de CC expandido “in vitro”.

### **3. Inmunosupresión en el SNC**

Tradicionalmente al cerebro se le ha considerado como un órgano “inmunológicamente privilegiado”, ya que existían indicios de reacciones inmunitarias mucho más leves en respuesta a trasplantes, respecto a otros órganos (Medawar, 1948; Barker y Billingham, 1977; Widner y Brundin, 1988). Esto se ha atribuido principalmente al aislamiento de este órgano por la BHE, estructura que separa el parénquima cerebral y el líquido cefalorraquídeo, de los vasos sanguíneos (Wekerle y col., 1986; Pachter y col., 2003). Otras características del SNC que podrían contribuir a la situación de respuesta inmunitaria reducida son la de carecer de sistema linfático (Brundin y col., 1988), poseer un bajo número de células presentadoras de antígenos y células T (Hart y Fabre, 1981; Fischer y Bielinsky, 1999; Lynch y Mills, 2012). Además, algunos autores plantean que el cerebro está dotado de un microambiente inmunosupresor debido a la particular expresión de citoquinas anti-inflamatorias (Williams y col., 2014). Sin embargo, este privilegio inmunológico no es absoluto, y numerosos estudios reportan el rechazo de trasplantes intracerebrales (Finsen y col., 1988; Mason y Morris, 1986; Sloan y col., 1991; Wood y col., 1992; Björklund y col., 2003). En este sentido, y en relación a la terapia antiparkinsoniana, estudios iniciales sugerían la supervivencia de xenotrasplantes de células dopaminérgicas mesencefálicas sin necesidad de inmunosupresión (Björklund y col., 1982). No obstante, trabajos posteriores demostraron respuestas inmunitarias en el SNC inducidas por los xenotrasplantes y rechazo si no se usaban fármacos inmunosupresores (Brundin y col., 1985; Finsen y col., 1988; Freed y col., 1988; Duan y col., 1995; Wood y col., 1996)

Está descrito que como en el caso de trasplantes extraneurales, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés “Major Histocompatibility Complex”) desempeña un importante papel en el rechazo de los trasplantes neurales (Duan y col., 1995). Este sistema lo conforman unas glicoproteínas de membrana presentes en la mayoría de especies animales, cuya función es la presentación de péptidos, procedentes de la digestión de antígenos proteicos citosólicos y extracelulares, a los linfocitos T. Siendo responsable, por ejemplo, de que el sistema inmune reconozca a células que hayan sido infectadas por virus o bacterias. Existen dos tipos de moléculas MHC: las de clase I, presentes de forma constitutiva en prácticamente todas las células nucleadas, e implicadas en la presentación antigénica a las células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>); y las de clase II expresadas sólo en células presentadoras de antígenos (células dendríticas, linfocitos B y macrófagos), y responsables de la presentación antigénica a las células T “Helper” (CD4<sup>+</sup>). En los trasplantes, el reconocimiento de las células del implante como propias o extrañas depende del complejo MHC, dado el gran polimorfismo de los diversos genes del mismo, determinando en gran medida el rechazo inmunológico. Estas reacciones inmunitarias tienen lugar tras el reconocimiento y presentación de las moléculas MHC del injerto a los linfocitos T del receptor, pudiendo darse mediante dos vías diferentes, la vía directa o indirecta (Gould y Auchincloss, 1999). La presentación directa implica el reconocimiento de las moléculas del MHC expresadas en el injerto por las células T del receptor, y la presentación indirecta implica el procesamiento de las moléculas del MHC del donante por parte de las células presentadoras de antígenos del receptor, y la presentación de los péptidos derivados de las moléculas del MHC del donante asociados al MHC del receptor, siendo presentados y reconocidos por los linfocitos T del receptor. Posteriormente en ambas vías de presentación antigénica, las células T se activan dando lugar a la liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios, que en los trasplantes neurales provocan un incremento en la permeabilidad de la BHE y en consecuencia, una infiltración de las células T que junto con los macrófagos y la microglía activada contribuyen al rechazo inmunológico (Finsen y col., 1991; Hickey y col., 1991; Brevig y col., 2000; Biernacki y col., 2001; Liu y Li, 2010). Varios estudios muestran cómo tras realizar trasplantes neurales, tiene lugar un aumento en la expresión de las moléculas MHC I y II en los implantes y alrededor de los mismos en el tejido cerebral (Mason y col. 1986; Date y col. 1988; Pollack y col. 1990; Sloan y col. 1990; Finsen y col. 1991; Wood y col. 1992; Isono y col. 1993; Duan y col., 1993, 1995). Además, como era de esperar, se observan

reacciones de rechazo inmunitario más intensas en los xenotrasplantes que en los alotrasplantes (Finsen y col., 1991). Por otro lado, se ha descrito una mayor supervivencia de los xenoimplantes neurales trasplantados en el cerebro si se eliminaban tanto las moléculas del MHC I como las del MHC II del tejido implantado, poniendo de manifiesto la importancia del complejo MHC en el rechazo de los xenotrasplantes neurales (Duan y col., 2001).

Existen evidencias que señalan que el rechazo de los xenoimplantes neurales está principalmente mediado por la interacción del complejo MHC y células T, siendo la vía indirecta la que desempeña un papel fundamental en el xenoreconocimiento neural (Chu y col., 1997; Chitilian y col., 1998). Concretamente, dentro de las poblaciones linfocitarias T, se ha mostrado la importancia de los linfocitos T "Helper" CD4<sup>+</sup> en los mecanismos de rechazo de los xenotrasplantes neurales. Varios trabajos exponen que la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD4<sup>+</sup>, con los que se consigue reducir la población de células T CD4<sup>+</sup> en los ratones trasplantados, induce la supervivencia de los xenoimplantes neurales en el cerebro, no obteniéndose los mismos efectos con la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD8<sup>+</sup> (Honey y col., 1991; Wood y col., 1996). Del mismo modo, experimentos de xenotrasplantes neurales muestran que en ratones deficientes del complejo MHCI la supervivencia de los xenoimplantes es prácticamente nula, siendo bastante más elevada en aquellos ratones deficientes del complejo MHCII (Duan y col., 2002).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que las reacciones inmunes en los xenotrasplantes y la inducción de la expresión de los antígenos MHC varían dependiendo de varios factores, como la elección de las especies de receptor y donante (disparidad genética entre ambos; Mason y col., 1986), la edad y el tipo del tejido donante (Zimmer y col., 1988; Marion y col., 1990), la edad del receptor (Lund y col., 1987) y la localización donde se realice el xenotrasplante (Widner y Brundin, 1988; Sloan y col., 1990), además del trauma generado durante el proceso quirúrgico (Widner y Brundin, 1993).

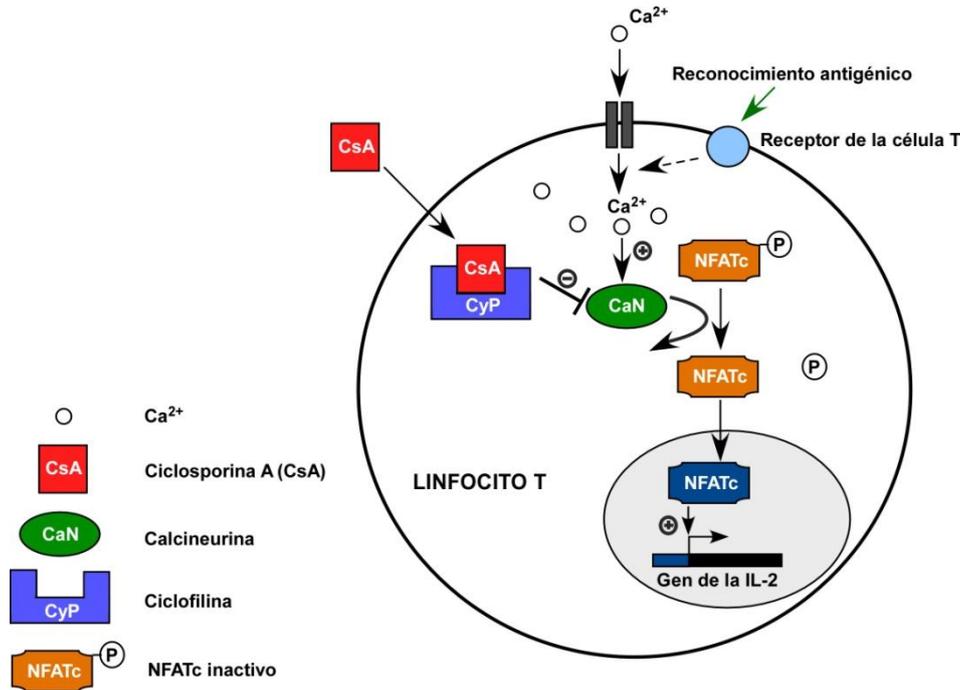
### **3.1. Terapia inmunosupresora con Ciclosporina**

En los últimos 20 años son muchos los estudios que han mostrado que el uso de ciclosporina como inmunosupresor determina una mayor supervivencia de los xenotrasplantes neurales, con mejor integridad del implante y reducción de la infiltración leucocitaria (Finsen y col., 1990; Pazkaban e Isacson, 1994; Pedersen y col.,

1995; Honey y Shen, 1999; Duan y col., 2002; Khoo y col., 2011; Hovakimyan y col., 2012). Este fármaco ha sido el más utilizado históricamente en terapias inmunosupresoras, ya que no presenta actividad citostática como es el caso de la azatioprina, inhibiendo específicamente la activación de las células T y evitando la proliferación leucocitaria sin producir leucopenia.

La ciclosporina fue descubierta en 1970 por Jean Borel, la cual fue aislada del hongo *Tolypocladium inflatum*. Posteriormente se utilizó la fermentación de este hongo a gran escala para la producción de la ciclosporina A (CsA), que es su principal metabolito activo. La CsA es un polipéptido lipofílico cíclico de 11 aminoácidos, perteneciente al grupo de fármacos denominados inhibidores calcineurínicos, que inhibe específicamente la proliferación de las células T. Además, se ha demostrado que la CsA posee propiedades antiinflamatorias (Borel y col., 1977), lo que también es beneficioso en los trasplantes. La CsA una vez atraviesa la membrana plasmática de las células T, se une a la proteína citosólica ciclofilina (CyP, del inglés "cyclophilin"). Este complejo CsA-CyP se une e inhibe a la enzima calcineurina fosfatasa (CaN). La CaN es activada en las células T cuando los niveles de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular aumentan (hecho que ocurre cuando la célula T se activa), de modo que actúa desfosforilando la subunidad citoplasmática del factor de transcripción nuclear de las células T activadas (NFATc, del inglés "nuclear factor of activated T cells"), permitiendo que migre al núcleo donde induce la transcripción de genes que codifican para varias citoquinas como la IL-2 o el IFN- $\gamma$ , y otras moléculas como el ligando Fas, CD40 y CD25, todas implicadas en la proliferación y expansión clonal de las células T. Por tanto, la CsA inhibe la ruta CaN- $Ca^{2+}$  evitando la traslocación al núcleo del NFATc-calcineurina, lo cual tiene como resultado la inhibición de la activación de las células T (Figura 10; Matsuda y col., 2000; Colombo y col., 2011).

A nivel génico la CsA aparte de inhibir la expresión de la IL-2 e IFN- $\gamma$ , también actúa sobre otras importantes citoquinas, tales como la IL-3, IL-4, o el TNF- $\alpha$ , fundamentales en la activación de los propios linfocitos T y, una vez secretadas, la de otros leucocitos como las células B y granulocitos. De hecho, aunque las células T son especialmente sensibles a la acción de este fármaco, las dianas moleculares del mismo se presentan en otros tipos celulares, de esta forma la CsA actúa en muchos tejidos, lo que explica alguno de los efectos secundarios que origina, destacando entre ellos la nefro y hepato toxicidad (Colombo y Ammirati, 2011).



**Figura 10. Esquema del mecanismo de acción de la CsA.** Ruta CaN-Ca<sup>2+</sup> inhibida por la CsA impidiendo la traslocación al núcleo del NFATc, lo cual inhibe la activación y proliferación de las células T (Modificado Colombo y Ammirati, 2011).

Existen varios protocolos de administración de la CsA en los trasplantes neurales en modelos murinos; que van desde la vía oral a la subcutánea (s.c) o intraperitoneal (i.p.), en concentraciones entre 10-30 mg/kg durante diferentes periodos de tiempo, y comenzando 2 o 3 días antes de la cirugía (Brundin y col., 1988; Finsen y col., 1988; Freeman y col., 1988; Pazkaban e Isacson, 1994; Isacson y col., 1995; Borlongan y col., 1999; Honey y col., 1999; Emborg y col., 2008; Yuen y col., 2011; Hovakimyan y col., 2012).

Además del uso de la monoterapia con CsA en xenotrasplantes neurales se ha descrito el beneficio de la administración conjunta con glucocorticoides, consiguiendo mejorar la supervivencia de los implantes y disminuyendo la infiltración de los leucocitos (Pedersen y col., 1995 y 1997). Los glucocorticoides poseen propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras. Estos fármacos, inhiben la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  entre otras (Auphan y col., 1995; Hricik y col., 1994; Kunicka y col., 1993), además de reducir la expresión de moléculas de adhesión en condiciones inflamatorias (Cronstein y col., 1992; Stanimirovic y col., 1994). El uso de glucocorticoides en la terapia combinada añadiría, frente a la

monoterapia con CsA, la acción antiinflamatoria necesaria para la superación del trauma quirúrgico inicial. Uno de los glucocorticoides que con frecuencia se utiliza es la prednisolona (Pred), metabolito activo de la prednisona, que una vez administrado atraviesa sin dificultad la membrana plasmática y se une a receptores citoplasmáticos específicos. Este complejo se transloca al núcleo e interacciona con regiones específicas del ADN activando o inhibiendo la expresión génica de diferentes citoquinas. La administración de la prednisolona y las dosis utilizadas en los trasplantes neurales de modelos murinos, consisten mayoritariamente en inyecciones diarias (s.c. o i.p.) suministradas independientemente pero de forma simultánea con el fármaco inmunosupresor CsA, durante los primeros días tras haberse realizado la cirugía (3-10 días), y en concentraciones entre 2-20 mg/kg (Pedersen y col., 1995 y 1997; Larsson y col., 2001; Wennberg y col., 2001). El hecho de no emplear este glucocorticoide una vez superada la inflamación inicial, se debe a los efectos adversos que produce, como una importante pérdida de peso (Duan y col., 1996).

La limitación de los tiempos empleados tanto en la monoterapia de la CsA como con la administración conjunta de la prednisolona viene dada por la complicación que supone el manejo de los animales inmunosuprimidos en largos periodos de tiempo, ya que aumenta la probabilidad de padecer infecciones además de verse afectado el bienestar del animal. Todo ello nos plantea la necesidad de establecer un protocolo inmunosupresor a largo plazo que fuera compatible con el modelo animal de parkinsonismo crónico inducido por MPTP.

# **OBJETIVOS**

# OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis fue realizar xenotrasplantes intraestriatales de CC de rata en un modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP en ratón. Este abordaje experimental permitiría el uso, como donante, de tejido carotídeo de diferentes especies, en ratones parkinsonianos receptores.

Los objetivos específicos del trabajo fueron:

1. Establecer un tratamiento inmunosupresor crónico que permita la supervivencia del xenotrasplante intraestriatal de CC de rata en ratón.
2. Analizar los efectos del tratamiento inmunosupresor, establecido en el objetivo 1, sobre el daño dopaminérgico inducido por la administración crónica de MPTP.
3. Estudiar los efectos del tratamiento inmunosupresor, establecido en el objetivo 1, sobre las alteraciones neuroinflamatorias inducidas por la administración crónica de MPTP.
4. Evaluar la eficacia antiparkinsoniana del xenotrasplante de CC de rata en el raton parkinsoniano inmunodeprimido.
5. Estudiar posibles acciones del trasplante de CC sobre los tipos celulares responsables de los fenómenos neuroinflamatorios inducidos por MPTP.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Animales de experimentación

### 1.1. Mantenimiento y cuidados generales

Para el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se usaron ratas Wistar y ratones C57BL/6N. Los animales fueron suministrados por el Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) o por los Laboratorios Charles River (España), y se mantuvieron a temperatura constante ( $22 \pm 1$  °C), en un ciclo alternante de luz-oscuridad de 12 horas, con libre acceso al alimento y al agua.

Todas las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo anestesiando a los animales mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con 100 mg/kg de ketamina (Pfizer, EE.UU.) y 10 mg/kg de xylacina (Bayer, Alemania). El sacrificio de los animales para la extracción de tejido se realizó mediante sobredosis de los anestésicos anteriormente mencionados (ketamina 200 mg/kg y xylacina 20 mg/kg). En todos los experimentos se siguieron las normas recogidas en la guía de cuidados animales de la Unión Europea (86/609/EEC), y todos los procedimientos experimentales realizados en este estudio han sido aprobados por el Comité Ético para la Investigación Animal del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

### 1.2. Modelo de parkinsonismo inducido por la administración crónica de MPTP

El modelo de parkinsonismo utilizado en esta tesis ha sido establecido anteriormente en el laboratorio (Muñoz-Manchado y col., 2016). El protocolo de administración de MPTP consistió en inyecciones s.c. de MPTP a 20 mg/kg, preparado a una concentración de 8,0 mg/ml en NaCl 0,9%, 3 veces por semana durante 3 meses. Para ello se utilizaron ratones macho de la cepa C57/BL6N de 8 semanas de edad. Como control se utilizaron ratones inyectados según su peso con la cantidad correspondiente de vehículo (NaCl 0,9%) en lugar de la solución de MPTP, a estos animales se les nombrará como *salinos* (SAL). La mayoría de los animales fueron sacrificados a los 3-4 días después de la finalización de la administración de la neurotoxina. Salvo en algunos

casos que se dejaron un mayor tiempo de lavado del MPTP, con objeto de tener una mejor visualización de los terminales dopaminérgicos estriatales.

### **1.3. Protocolos de Inmunosupresión compatibles con el modelo de parkinsonismo inducido por administración crónica de MPTP**

Para llevar a cabo los estudios de inmunosupresión, se establecieron tres protocolos de administración de CsA y Pred, los cuales consistían en inyecciones s.c. independientes de CsA (15 mg/kg; Sigma, EE.UU.) y Pred (20 mg/kg; Sigma, EE.UU.) durante 5 semanas. Ambos fármacos se prepararon a una concentración de 6-8 mg/ml respectivamente, para lo cual se disolvieron primero en una solución de etanol absoluto, y posteriormente se diluyeron en NaCl 0,9% (Sigma, EE.UU.) hasta alcanzar las concentraciones anteriormente indicadas en una solución salina al 25% de etanol (EtOH). En el caso de la CsA se facilitó su disolución calentando la solución final en el baño a 56°C hasta que se volviera transparente. Para la disolución de la solución final de Pred, se realizaron 10 ciclos de sonicación con una duración de 20 segundos/ciclo (sonicador, SELECTA SANILABO S.L., España).

Los tres protocolos de inmunosupresión desarrollados se diferenciaban en la frecuencia de la administración de la CsA y Pred, tal y como se describe a continuación:

- 1) Protocolo *severo* (*sev*): inyecciones s.c. diarias de CsA y Pred.
- 2) Protocolo *intermedio* (*interm*): inyecciones s.c. diarias de CsA y Pred durante las 3 primeras semanas, y en las dos semanas restantes del tratamiento inyecciones diarias alternando CsA y Pred.
- 3) Protocolo *leve*: inyecciones s.c. diarias de CsA y Pred durante las 2 primeras semanas, la tercera semana se administran inyecciones diarias alternando CsA y Pred., y durante las dos semanas finales del tto se inyecta CsA 3 veces por semana (véase Figura 17 de resultados).

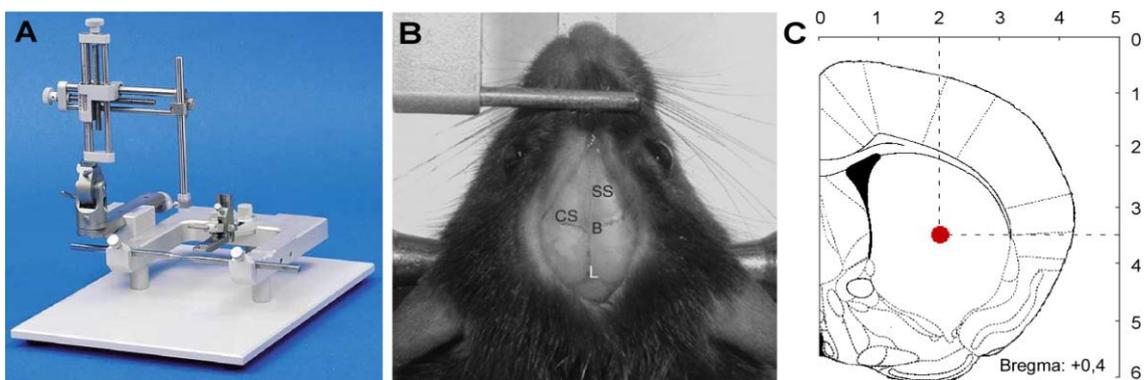
Como control se utilizaron ratones inyectados s.c. según su peso con la cantidad correspondiente de vehículo (solución salina al 25% de EtOH). A estos animales se les nombrará como *vehículos* (*veh*).

## 2. Xenotrasplantes intraestriatales de cuerpo carotídeo de rata

A todos los ratones trasplantados se les suministró 15 mg/kg de CsA en una inyección s.c 3 horas antes de comenzar el procedimiento quirúrgico. Posteriormente fueron anestesiados como se indicó en el apartado 1.1. Una vez anestesiados los animales, se les administró una inyección intramuscular (i.m.) de penicilina (10000 U.I.; Penilevel 106 U.I., Laboratorios ERN, España). La región dorsal de la cabeza del animal se rasuró y desinfectó con polividona yodada al 10% (Betadine, MEDA Pharma, España). A continuación, se realizó un corte longitudinal con el bisturí separando la piel de los laterales del cráneo. Seguidamente se procedió a la fijación de la cabeza del animal al instrumento estereotáxico (Stoelting, EE.UU.; Figura 11A) mediante unas barras laterales de sujeción extraauricular, además de fijar los incisivos superiores en un dispositivo horizontal (barra dental; Figura 11B), para conseguir una absoluta inmovilización de la cabeza del animal. Posteriormente, la aguja de inyección se colocó sobre los puntos de intersección de las suturas craneales Bregma y Lambda, posicionando ambos puntos en el mismo plano horizontal y empleando para ello el accesorio corrector de altura de la barra dental. Con objeto de nivelar el cráneo horizontalmente se colocó la aguja sobre Bregma, confirmando que dicho punto se encontraba sobre el mismo plano que dos puntos desplazados 2 mm lateralmente a derecha e izquierda de Bregma. Fijada apropiadamente la cabeza del animal en el aparato estereotáxico y tomando como referencia al punto Bregma, se establecieron las coordenadas de inyección: AP:+0,4; L:+2; DV:-3,5 mm, de acuerdo con el Atlas Franklin y Paxinos (1997; Figura 11C).

El tejido utilizado para los trasplantes, CC, se extrajo y disecó a partir de los animales donantes (ratas Wistar de 1 mes de edad) previamente anestesiados. La extracción de la bifurcación carótida se realizó mediante una incisión ventral a la altura del cuello del animal, posteriormente se separó la piel y capa muscular presente hasta localizar la arteria carótida. A continuación se comprimió cada arteria con la ayuda de unas pinzas hemostáticas curvas y se procedió a la extracción de las bifurcaciones. Una vez extraídas, las bifurcaciones carotídeas se sumergieron en solución Tyrode  $2Ca^{+2}$   $1Mg^{+2}$  [NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM,  $CaCl_2 \times 2H_2O$  2 mM,  $MgCl_2 \times 6H_2O$  1 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5mM, piruvato 5mM, (Sigma, EE.UU.); pH 7,4], a 4°C. Para sustraer el CC se fijaron las bifurcaciones carotídeas en la base de una placa de Petri, de 60 mm de

diámetro, con el fondo recubierto de Sylgard (Dow Corning Corporation, EE.UU.) y se disecó el CC en solución Tyrode  $2\text{Ca}^{+2}$   $1\text{Mg}^{+2}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  mediante el uso de pinzas y tijeras de iridectomía (World Precision Instruments, EE.UU.). Una vez disecado, el CC se seccionó en cuatro fragmentos de similares dimensiones, y éstos se depositaron en solución Tyrode  $2\text{Ca}^{+2}$   $1\text{Mg}^{+2}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para evitar que los trozos de CC se quedaran adheridos a las paredes del material utilizado, todo plástico o vidrio empleado se puso en contacto con medio DMEM (GibcoBRL, Alemania) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GibcoBRL, Alemania).



**Figura 11. Sistema de estereotaxia utilizado para la realización de los trasplantes de cuerpo carotídeo en ratón.** A. Instrumento estereotáxico usado para el trasplante intraestriatal, en el que la cabeza del animal queda fijada mediante unas barras laterales de sujeción extra auricular y una barra dental. B. Fotografía de un cerebro de ratón en plano axial; SS indica la sutura sagital, CS indica la sutura craneal, B indica Bregma y L indica Lambda. C. Hemisección frontal del cerebro de ratón, acorde con el atlas de Franklin y Paxinos (1997), mostrando el lugar en el que se realizó el trasplante (rojo) en el estriado; las coordenadas estereotáxicas del implante, respecto a Bregma, fueron (en mm): anteroposterior (AP):+0,4; lateral (L):+2; dorsoventral (DV):-3,5.

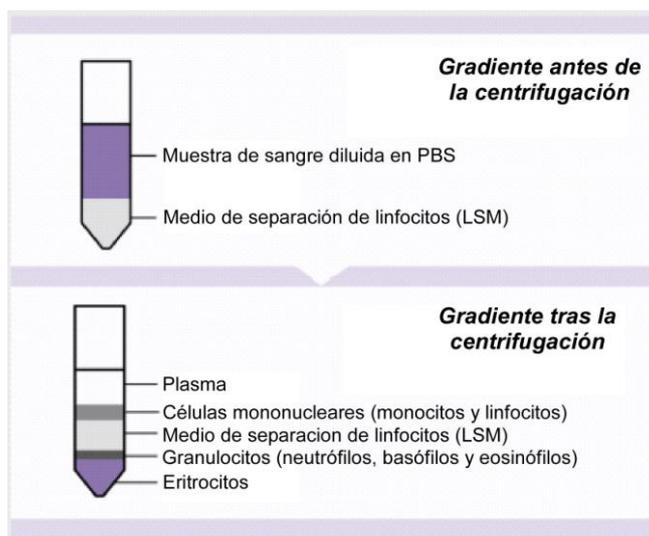
Los fragmentos de CC obtenidos se introdujeron mediante aspiración en una jeringa de  $2\ \mu\text{l}$  de volumen con aguja de punta roma (Hamilton, EE.UU.) en un volumen final de  $1\ \mu\text{l}$  de Tyrode  $2\text{Ca}^{+2}$   $1\text{Mg}^{+2}$ . El trasplante se realizó en las coordenadas anteriormente descritas. Una vez alcanzadas dichas coordenadas, y con objeto de eludir una posible compresión del tejido, se profundizó la aguja  $0,3\ \text{mm}$  en el eje dorsoventral para volver  $1\ \text{minuto}$  después a las mismas coordenadas e inyectar el volumen total de la jeringa. Tras  $1\ \text{minuto}$  de la inyección, la aguja se extrajo lentamente del cerebro. En el hemisferio control se introdujo  $1\ \mu\text{l}$  de solución Tyrode  $2\text{Ca}^{+2}$   $1\text{Mg}^{+2}$  siguiendo el mismo procedimiento experimental.

La región intervenida quirúrgicamente se suturó con seda trenzada y posteriormente se desinfectó con solución de povidona. Finalmente y con objeto de evitar posibles

hipotermias tras la intervención quirúrgica, los animales trasplantados fueron dispuestos sobre una almohadilla eléctrica (Intersan S.A., España) durante 2 horas.

### 3. Citometría de flujo

Con objeto de analizar las poblaciones linfocitarias de aquellos ratones trasplantados y tratados con inmunosupresión o vehículo (controles), se les extrajo ~700  $\mu$ l de sangre del ventrículo izquierdo con una aguja heparinizada (Heparina, 5000 U/ml; Applichem, Alemania). A estos ~700  $\mu$ l de sangre periférica se les añadió el mismo volumen de PBS [137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (Sigma, EE.UU.)]. La muestra de sangre diluida se depositó sobre ~930  $\mu$ l de *Lymphocyte Separation Medium* (LSM), (LSM 1077; PAA, The Cell Culture Company, Austria) cuya densidad es de 1,077 g/ml. Las muestras de sangre + LSM se centrifugaron a 516 g durante 25 minutos a 20°C, obteniéndose un gradiente de densidad de los diferentes componentes celulares de la sangre (Figura 12).



**Figura 12. Esquema de los diferentes gradientes de densidad obtenidos antes y después de la centrifugación de las muestras con la sangre diluida + LSM.**

Tras la centrifugación, se recogió la capa de las células leucocitarias mononucleares (monocitos y linfocitos), a la que se le añadió ~500  $\mu$ l de PBS, centrifugándolo todo a 290 g durante 10 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células, y de nuevo se volvió a repetir el mismo procedimiento. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1 ml de solución FACS [0.2% BSA (Sigma,

EE.UU.), 0.25% Penicilina/Estreptomina (Invitrogen, EE.UU.), 10 mM HEPES (Sigma EE.UU.), 5 mM EDTA (Biorad, EE.UU.) en 44 ml Medio Leibovitz's L-15 (Gibco, Alemania), y 4.5 ml H<sub>2</sub>Omq]. De estas células resuspendidas en FACS, tomamos 100 µl, a los cuales añadimos los anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos (Tabla 1), con la finalidad de marcar a la población total de células T (identificadas como CD3<sup>+</sup>), y dentro de ésta detectar a las subpoblaciones de los linfocitos "Helper" (identificados como CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (identificados como CD8<sup>+</sup>). Las muestras se agitaron empleando el vórtex, y se incubaron con los anticuerpos durante 15 minutos en oscuridad a 20°C. Posteriormente se añadieron 500 µl de PBS y se centrifugó a 800 g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y añadimos 300 µl de FACS, se agitaron nuevamente las muestras y fueron estudiadas en el citómetro de flujo BD LSR FORTRESSA. Para el análisis de los datos se empleó el software FACS Diva versión 6.2, con el que se obtenía el número de eventos (células) en cada experimento y el porcentaje de linfocitos T pertenecientes a cada subpoblación celular marcada. Por tanto, partiendo del volumen de sangre periférica extraída y del número de células detectadas por el citómetro, se determinó el número absoluto de células leucocitarias mononucleares por µl de sangre periférica. Estos datos se expresan en porcentaje respecto al control, además de mostrar los porcentajes de los linfocitos T marcados respecto al total de las células mononucleares.

ANTICUERPO	FLUOROCROMO CONJUGADO	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Monoclonal de ratón anti-CD3 <sup>+</sup>	Alexa flúor 700	1:50	561388	<i>BD Pharmigen</i>
Monoclonal de ratón anti-CD4 <sup>+</sup>	R-Ficoeritrina (R-PE)	1:20	M4PE-02MG	<i>Inmunostep</i>
Monoclonal de ratón anti-CD8 <sup>+</sup>	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	1:20	M8AF-05MG	<i>Inmunostep</i>

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la detección de las poblaciones linfocitarias T mediante citometría de flujo.**

## **4. Técnicas histológicas**

### **4.1. Procesamiento del tejido y corte**

Los animales previamente anestesiados (véase punto 1.1) fueron perfundidos mediante infusión intracardiaca con PBS a 20°C en primer lugar y después, para fijar el tejido, con paraformaldehído (Sigma, EE.UU.) al 4% en PBS a 4°C, empleando una bomba de infusión automática (High Precision Multichannel Pump, ISMATEC, Suiza), a una velocidad de 9 ml/min. Seguidamente se llevó a cabo la extracción quirúrgica del tejido y se procedió a la post-fijación del mismo, sumergiendo al tejido en la misma solución fijadora en agitación a 4 °C durante 12-16 horas. Posteriormente el tejido es lavado en PBS (Sigma, EE.UU.) a 4°C durante 5 minutos. Los tejidos se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS (Sigma, EE.UU.) para su crioprotección, hasta que el tejido descendía al fondo del tubo (24-30 horas). La inclusión se realizó en un criopreservante (OCT, Tissue Tek, Electrón Microscopy Sciences, EE.UU.) utilizando moldes de distinto tamaño según el tejido (Cryomold, Tissue Tek, Electrón Microscopy Sciences, EE.UU.). Los bloques obtenidos se conservaron a -80°C hasta su corte, que se llevó a cabo utilizando un criostato (Leica, Alemania) mantenido a distintas temperaturas según el tejido (-25 y -28°C para cerebro y bifurcaciones respectivamente). El cerebro se cortó en secciones de 30 µm que se recogieron en PBS a 4°C. Los cortes que no iban a ser analizados inmediatamente se conservaron en solución de crioprotección [glicerol 30%, etilenglicol 30% (Sigma, EE.UU.), en PBS] a -20°C.

### **4.2. Inmunohistoquímica sobre secciones de criostato en flotación**

Para realizar la inmunohistoquímica de secciones de cerebro de 30 µm de grosor cortadas en criostato, se procedió siguiendo los pasos que se detallan a continuación: Se realizaron 2 lavados con las muestras de tejido, durante 5 minutos cada uno con PBS en placas de poliestireno de 6 pocillos con la ayuda de unas cestas (“Netwell”, 500 µm, Corning, EE.UU.). Después las secciones fueron sumergidas en PBTx 0,3% [137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tritón X-100 0,3% (Sigma, EE.UU.)] durante 15 minutos para conseguir una mayor permeabilización. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS durante 5 minutos y se procedió a la inactivación de la actividad de la peroxidasa endógena, mediante la incubación durante 30 minutos a 4°C en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka, Suiza) al 0,4% en PBS. Se realizaron

de nuevo 2 lavados con PBTx 0,1%, y a continuación se pasaron las rodajas a placas de poliestireno (Nunc, Dinamarca) de 12 pocillos donde se incubaron las secciones en solución de bloqueo [10% suero neonatal bovino (Gibco, España) y albúmina bovina (Sigma, EE.UU.) a 1mg/ml en PBTx 0,1%] durante 2 horas a 4°C. El objeto de emplear esta solución es producir el bloqueo de las uniones inespecíficas del anticuerpo debido a la elevada concentración proteica de la misma. Tras el bloqueo las secciones se incubaron entre 12 y 16 horas a 4°C con el anticuerpo primario, diluido también en solución de bloqueo. A continuación, se realizan 4 lavados del anticuerpo primario en placas de poliestireno de 6 pocillos con PBTx 0,1%, de 10 minutos cada uno. Seguidamente las rodajas se incubaron con el anticuerpo secundario [kit Dako EnVision+System-HRP (DAB), Dako, Dinamarca] durante 2 horas a 20°C en placas de 12 pocillos. Tras la incubación se lavó el anticuerpo secundario 4 veces durante 5 minutos cada uno, en placas de poliestireno de 6 pocillos con PBTx 0,1%. Luego, los cortes se dispusieron en pocillos cóncavos de vidrio. Se preparó la solución de revelado con diaminobencidina siguiendo las instrucciones del fabricante [kit Dako EnVision+System-HRP (DAB), Dako, Dinamarca]. La reacción fue detenida mediante varios lavados con PBS.

Los anticuerpos primarios utilizados se indican en la tabla 2. Los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón pertenecían al kit Dako EnVision+System-HRP (Dako, Dinamarca).

Para los anticuerpos que marcan los oligodendrocitos (MBP y CNPasa), antes de comenzar la inmunohistoquímica, se les realizó el desenmascaramiento antigénico, para lo cual las secciones fueron pretratadas con buffer citrato 10mM, pH 6,0, durante 20 minutos a 65°C. De igual modo se procedió en la inmunofluorescencia, la cual será explicada a continuación.

ANTICUERPO 1°	ESPECIFICIDAD	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Policlonal de conejo anti-TH <sup>+</sup> (Tyrosine Hydroxylase)	Células dopaminérgicas	1:1000	NB 300-109	<i>Novus Biologicals</i>
Policlonal de conejo anti-GFAP <sup>+</sup> (Glial Fibrillary Acidic Protein)	Astroцитos	1:500	Z 0334	<i>Dako</i>
Policlonal de conejo anti-IBA1 <sup>+</sup> (Ionized Calcium Binding Adapter Molecule 1)	Microglía	1:500	019-19741	<i>Rafer-Wako</i>
Monoclonal de ratón anti-MBP (Myelin Basic Protein)	Oligodendrocitos	1:30000	MAB 1580	<i>Merck Millipore</i>
Monoclonal de ratón anti-CNPasa <sup>+</sup> (2',3'-cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase)	Oligodendrocitos	1:1000	Ab 6315	<i>ABCAM</i>

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en la detección inmunológica con DAB.**

### 4.3. Inmunofluorescencia sobre secciones de criostato

La inmunofluorescencia en secciones de criostato se realizó siguiendo los mismos pasos que en la inmunohistoquímica (véase punto 4.2), hasta la incubación con el anticuerpo primario (utilizando los anticuerpos 1° anti-TH<sup>+</sup>, anti-MBP<sup>+</sup> y anti-CNPasa<sup>+</sup>; ver tabla 2). Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBTx 0,1% (10 minutos cada uno) y se procedió a incubar las rodajas con los anticuerpos secundarios durante 4 horas a 20°C (tabla 3). A continuación, se lavaron 4 veces con PBTx 0,1% (5 minutos cada uno), seguidamente 2 lavados con PBS (5 minutos cada uno), y tras estos lavados se aplica el compuesto 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; BIOLINK, EE.UU.), el cual es un

marcador fluorescente nuclear, dando una coloración azul. Los cortes se incubaron con DAPI diluido a una concentración 1:1000 en PBS durante 10 minutos. Por último se realizaron 2 lavados con PBS (5 minutos cada uno).

ANTICUERPO 2°	FLUORÓFORO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Policlonal de cabra anti conejo	ALEXA 568	1:400	<i>Invitrogen</i>
Policlonal de cabra anti ratón	ALEXA 568	1:500	<i>Invitrogen</i>
Policlonal de burro anti ratón	ALEXA 488	1:200	<i>Invitrogen</i>
Policlonal de cabra anti conejo	Cy5	1:500	<i>Jackson ImmunoResearch</i>

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en la inmunofluorescencia.**

#### **4.4. Montaje de los cortes**

El montaje de las secciones a las que se les realizó inmunohistoquímica, se llevó a cabo utilizando una mezcla de glicerol al 50% en PBS-azida 0,02%. En cambio, para los cortes en los que se había realizado inmunofluorescencia se utilizó el medio específico para fluorescencia (Dako, Dinamarca).

### **5. Técnicas de análisis histológico**

El análisis histológico se realizó con la ayuda de un microscopio con cámara acoplada (BX61-Olympus; con óptica UPlan FL, y cámara refrigerada DP70).

#### **5.1. Microscopía confocal**

Las secciones fluorescentes de los cerebros fueron examinadas usando un microscopio Confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Exton, PA) con los objetivos 20x y 63x con glicerol. Posteriormente fueron analizadas con el software LCS Lite (Leica

Microsystems, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas con un pinhole Airy 1. En determinadas secciones cerebrales con el fin de estudiar con más detalle la distribución celular en el eje z, se realizó un z-stack de un total de 20 planos, siendo la distancia adquirida entre los mismos de 1,5  $\mu\text{m}$  de grosor.

## 5.2. Densitometría

Para la estimación del grado de tinción de la inmunohistoquímica de TH (con la que se analizó la innervación estriatal), GFAP y MBP (en las que se estudió la reacción astrogliar y oligodendroglial respectivamente en estriado y SNpc) se utilizaron medidas de densidad óptica. Para asegurar la homogeneidad de los datos los tiempos de revelado de la tinción inmunohistoquímica en todos los animales del mismo experimento y se tomaron microfotografías con las mismas condiciones de luz y tiempo de exposición. Las medidas de densidad óptica se realizaron mediante el programa “NIH Image J” (“National Institutes of Health”, versión 1.61). En la inmunohistoquímica de TH<sup>+</sup> a los valores densitométricos obtenidos para el estriado se les restó como fondo el valor de la corteza cerebral, que no es inmunoreactiva para TH. En cambio, en las inmunohistoquímicas GFAP<sup>+</sup>/MBP<sup>+</sup>, debido a que el marcaje de ambos está presente en toda la rodaja, a los valores obtenidos tanto de estriado como de SNpc se les restó como fondo el valor de una rodaja de la región anatómica analizada, la cual fue incubada sin la presencia del anticuerpo 1°.

En los experimentos en los que se estudió el efecto del tratamiento inmunosupresor en el modelo de parkinsonismo inducido por MPTP, para el análisis del estriado se utilizaron 3 cortes a distintos niveles respecto a Bregma: 1,10; 0,14 y -0,22 mm, según el atlas de Franklin y Paxinos (Franklin y Paxinos, 1997). En cada corte se halló el valor de densidad óptica del área de estriado delimitada por una circunferencia de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro situada en el centro de cada hemisferio. Para cada animal se calculó el valor medio de las 3 secciones. El análisis de la SNpc se realizó superponiendo las regiones cerebrales correspondientes a los niveles comprendidos entre -3,08 y -3,28 según el atlas de Franklin y Paxinos (1997), estudiando la zona donde la SNpc se encuentra separada de la VTA (del inglés “ventral tegmental area”) por el MT (núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio), basándonos en el trabajo de Sauer (Sauer y col., 1994). Se utilizaron 3 cortes, siendo las secciones anterior y posterior a la que posee el tracto medio las cuantificadas. Para cada animal se calculó el valor medio de las 3 secciones.

En el análisis del estriado de los animales trasplantados con CC, el área estudiada se determinó a partir de una circunferencia de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro alrededor del trasplante, y se descartaron los valores obtenidos en el tejido implantado, mediante una circunferencia de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por tanto, los valores densitométricos obtenidos se corresponden a la región comprendida entre ambas circunferencias. Dicho análisis se llevó a cabo tanto en el hemisferio trasplantado como en el hemisferio control. En total, se cuantificaron 3 cortes por cada animal: el que presentaba mayor tamaño de trasplante y los que se encontraban a  $\pm 90 \mu\text{m}$  de éste en el eje anteroposterior.

### **5.3. Técnicas estereológicas**

La cuantificación no sesgada del número de células, área, y volumen, en distintos experimentos realizados en esta tesis, se llevó a cabo mediante técnicas estereológicas. Dichas técnicas se aplicaron utilizando el sistema “Visiopharm Integrator System” (Olympus, Dinamarca).

#### **5.3.1. Estimación de volumen: Método de Cavalieri**

Para estimar el volumen se aplicó el “principio de Cavalieri” (Cavalieri, 1966), según el cual el volumen de un objeto puede ser estimado a partir de secciones paralelas separadas por una distancia conocida ( $t$ ). Por lo que siendo conocida esta distancia de separación y obteniendo el área de cada sección, se puede calcular el volumen total del órgano. Para calcular el área de cada sección ( $A_i$ ), a éstas se les coloca de forma aleatoria una retícula de puntos, en las que cada uno de los puntos conlleva un área asociada [ $a(p)$ ] determinada (Figura 13A). De esta forma el área de cada sección es simplemente el número total de puntos multiplicados por el área asociada al punto:

$$A_i = a(p) \cdot \Sigma P$$

El volumen de cada sección es por tanto este área ( $A_i$ ) por el valor de la distancia de separación ( $t$ )

$$V_i = A_i \cdot t_i$$

Por lo que, el volumen total de un objeto que cumpla estas condiciones será el sumatorio de los volúmenes de cada sección:

$$V = A_i + A_j + A_k + \dots + A_z$$

Así que al ser la distancia de separación (t) en todas las secciones, el volumen total del objeto en cuestión se puede estimar a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen} = t \cdot a(p) \cdot \Sigma P$$

donde t = grosor de las secciones; a(p) = área asociada al punto;  $\Sigma P$  = número total de puntos incluidos en el tejido en estudio.

### **5.3.1.1. Análisis del volumen de cuerpo carotídeo trasplantado**

Para determinar el volumen de CC trasplantado se aplicó el método de Cavalieri anteriormente explicado, en secciones coronales de cerebros de 30  $\mu\text{m}$  de grosor teñidos mediante inmunohistoquímica de TH. Para ello, se utilizó una retícula de puntos con un  $a(p) = 557,1 \mu\text{m}^2$ , lanzada aleatoriamente por el sistema estereológico en todas las secciones analizadas.

### **5.3.2. Cuantificación del número de células: Disector óptico**

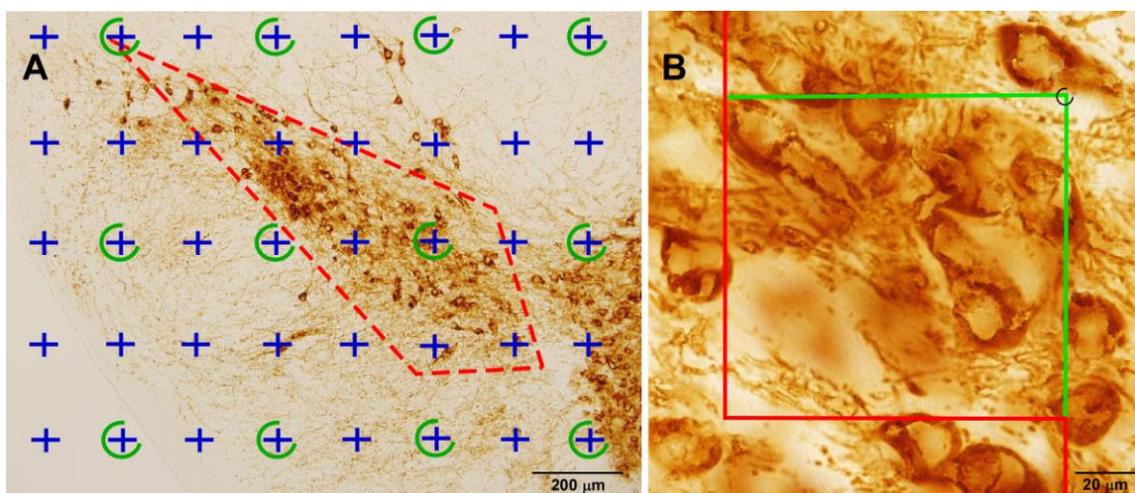
Con objeto de cuantificar el número de células se utilizó la técnica estereológica del disector óptico (West, 1993). Para ello en la zona de tejido que se quería cuantificar, se realizó un muestreo aleatorio utilizando disectores ópticos de un tamaño determinado según sea el tipo celular. Para asegurar el buen estado histológico de las zonas analizadas se excluyeron 5  $\mu\text{m}$  en ambas superficies de cada sección, correspondientes a la superficie de la sección en la que se produce el corte histológico.

#### **5.3.2.1. Cuantificación del número de neuronas de la SNpc**

Las células de la SNpc marcadas mediante inmunohistoquímica para  $\text{TH}^+$  en secciones de criostato de 30  $\mu\text{m}$  de grosor, fueron cuantificadas estereológicamente mediante un muestreo aleatorio de disectores ópticos de 135476  $\mu\text{m}^3$  (Figura 13B). Se analizó la región de la SNpc comprendida entre -3,08 y -3,28 mm en el eje anteroposterior respecto a Bregma, según el atlas de Franklin y Paxinos (Franklin y Paxinos, 1997).

Para ello se utilizaron 5 cortes, siendo las 2 secciones anteriores y las 2 posteriores a la que posee el tracto medio las cuantificadas.

El volumen completo de la SN se estimó de acuerdo al principio de Cavalieri anteriormente descrito (ver apartado 5.3.1., Figura 13A).



**Figura 13. Estimación del volumen y cuantificación del número de neuronas TH<sup>+</sup> de la SNpc mediante el principio de Cavalieri y el disector óptico.** A. Inmunohistoquímica de TH en un corte a nivel del mesencéfalo mostrando las células dopaminérgicas de la SN. El área analizada, delimitada con la línea roja, se calculó según el principio de Cavalieri, mediante la retícula de cruces (ver texto). B. A mayor aumento se observa el tamaño del disector usado para contar las células. Los disectores eran repartidos al azar por todo el área mediante el sistema “Visiopharm Integrator System”.

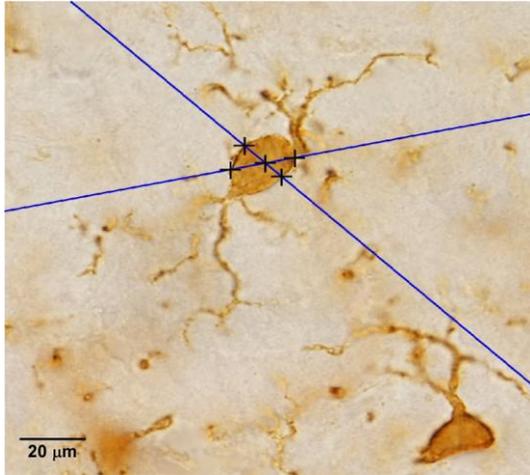
### 5.3.2.2. Cuantificación del número de oligodendrocitos en el Estriado en los animales trasplantados con CC

Para la estimación del número de los oligodendrocitos en el estriado se realizó un muestreo aleatorio de disectores de tamaño  $338823,6 \mu\text{m}^3$  en la zona circundante al trasplante de forma similar a la utilizada en el apartado 5.2. Se cuantificaron 3 cortes por cada animal: el que presentaba mayor tamaño de trasplante y los que se encontraban a  $\pm 180 \mu\text{m}$  de éste en el eje anteroposterior.

### 5.3.3. Cuantificación del número y volumen del soma de las células microgliales en el Estriado y SNpc

La estimación del número de células microgliales se llevó a cabo mediante muestreo aleatorio de disectores ópticos de tamaño  $338823,6 \mu\text{m}^3$  para el estriado, y de  $254494,2 \mu\text{m}^3$  para la SNpc, procediendo tal y como se describe en el apartado 5.3.2.

Debido a los cambios morfológicos que sufre la microglía cuando se activa, determinamos medir el volumen del soma microglial usando la técnica estereológica del rotador vertical (Tandrup y col., 1997). Un método estereológico por el cual el volumen celular se infiere a partir de la intersección de los límites de la célula respecto a 2 planos imaginarios dispuestos de forma aleatoria perpendicularmente entre sí (Figura 14).



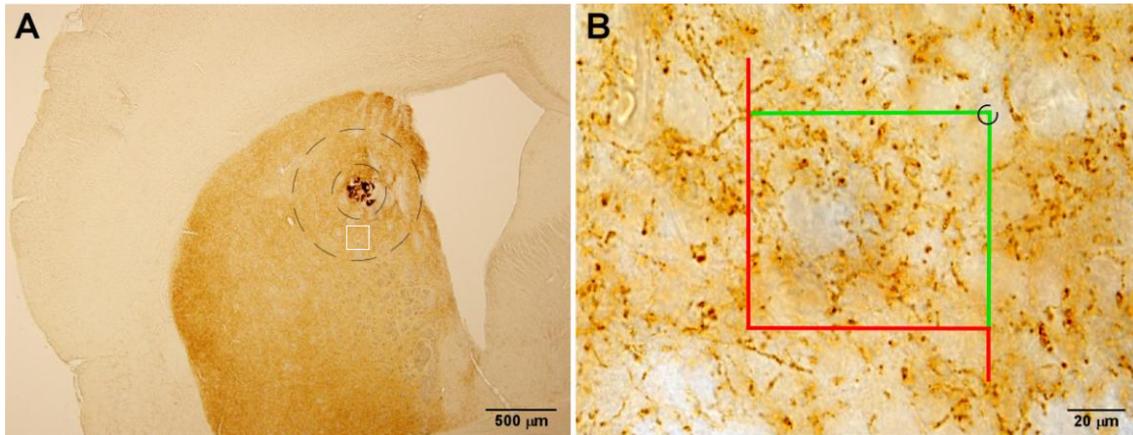
**Figura 14. Estimación del volumen de las células microgliales ( $\mu\text{m}^3$ ) mediante el método estereológico rotador vertical.** Método de rotador vertical, según el cual a partir de la intersección entre el centro y los límites de la célula respecto a las dos líneas dispuestas aleatoriamente perpendiculares entre sí (representados por líneas azules). El volumen celular lo infiere el sistema a partir de la intersección de estos planos con la célula.

#### **5.3.4. Estudio de varicosidades dopaminérgicas ( $\text{TH}^+$ ) en el Estriado**

Para medir la inervación estriatal, además de las medidas densitométricas anteriormente descritas, se realizó la cuantificación estereológica de las varicosidades  $\text{TH}^+$  en el estriado, con objeto de obtener un valor más preciso de la medida. Para ello se usó la técnica estereológica del disector óptico.

En los animales trasplantados con CC se midió el área circundante al trasplante de forma similar a la utilizada en la cuantificación densitométrica (véase apartado 5.2.). Así, se trazó una circunferencia de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro alrededor del trasplante y otra de menor diámetro (250  $\mu\text{m}$ ) rodeando al tejido implantado. El área analizada fue la comprendida entre las dos circunferencias (Figura 15A). Dicho análisis se llevó a cabo tanto en el hemisferio trasplantado como en el hemisferio control. El tamaño del disector óptico fue de 2280  $\mu\text{m}^3$  (Figura 15B), y se calculó el número de varicosidades en referencia al volumen de estriado analizado. Se analizaron los mismos cortes que en el apartado 5.2.

En los animales no trasplantados, se analizó únicamente una circunferencia de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro localizada en la región central del estriado, procediendo al muestreo de la misma tal y como se describe en el apartado 5.2.



**Figura 15. Cuantificación de varicosidades TH<sup>+</sup> en el estriado de animales trasplantados con CC.** A. Inmunohistoquímica de TH en un corte coronal de estriado mostrando el área analizada para la cuantificación de varicosidades TH<sup>+</sup>, comprendida entre las dos circunferencias de puntos discontinuos. En B se muestra a mayor aumento el recuadro blanco indicado en A, mostrando el disector utilizado para cuantificar las varicosidades mediante el sistema “Visiopharm Integrator System”.

## 6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante el programa SigmaPlot 12.2 (Systat Software Inc., EE.UU.). Los valores se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (e.e.m).

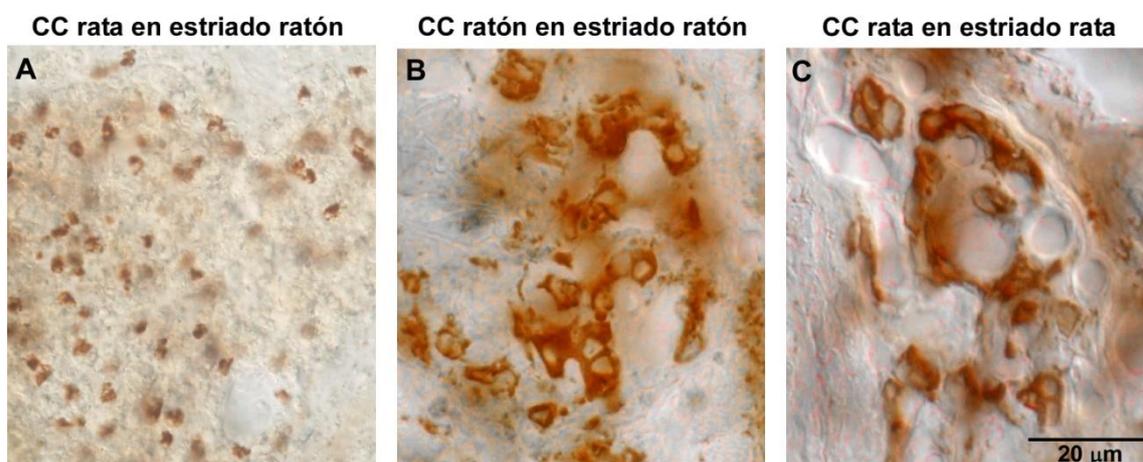
Para llevar a cabo el análisis de los datos se aplicó el test “t de Student” cuando se compararon dos grupos independientes. Y cuando se trabajó con más de dos grupos, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Bonferroni. Las diferencias obtenidas se consideraron significativas cuando el nivel de significación (p) fue  $\leq 0,05$ .

# **RESULTADOS**

# RESULTADOS

## 1. Protocolo de inmunosupresión

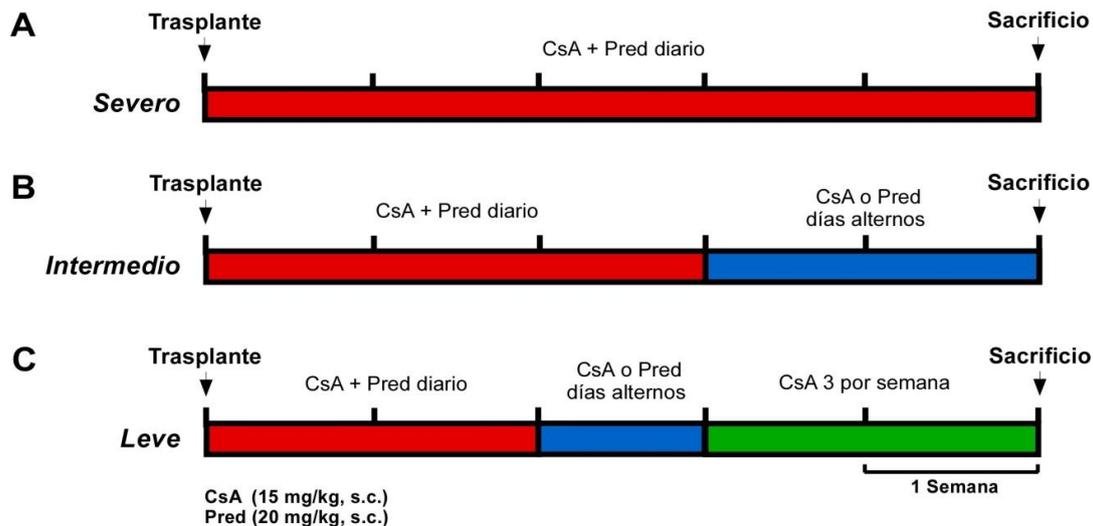
Dado que el objetivo general de esta tesis ha sido la realización de xenotrasplantes de CC de rata en el estriado de ratón, y debido a las discrepancias antes descritas sobre el rechazo inmunológico en el SNC (véase punto 3 de Introducción), se llevó a cabo un primer estudio piloto con objeto de comprobar la existencia de dicho rechazo. Para ello se realizaron xenotrasplantes intraestriatales de CC de rata en ratones receptores (n=3), y como controles trasplantes de CC de ratón en ratones receptores (n=3) y de CC de rata en ratas receptoras (n=3). La supervivencia del tejido carotídeo trasplantado se analizó a las 5 semanas tras el implante mediante inmunohistoquímica usando la TH como marcador de las células glómicas. Como se indica en la Figura 16A, todos los xenotrasplantes mostraron claros signos de rechazo inmunológico. Sin embargo, los trasplantes intraespecies de rata y ratón presentaban el característico fenotipo TH<sup>+</sup> del CC, con numerosos glomérulos de células glómicas (Figura 16B, C). Estos resultados, mostraron claramente la necesidad de establecer un protocolo de inmunosupresión que permita la supervivencia de los xenotrasplantes estriatales de CC.



**Figura 16. Trasplantes intraestriatales de CC.** Microfotografías de cortes coronales de estriado teñidos mediante inmunohistoquímica de TH mostrando el trasplante intraestriatal de CC de: rata en ratón (A), de ratón en ratón (B) y de rata en rata (C). Los xenotrasplantes mostraron claros signos de rechazo inmunológico (A), hecho que no ocurre en los trasplantes intraespecies de ratón (B) y rata (C). En cada caso (n=3) los animales trasplantados con CC se perfundieron a las 5 semanas del implante.

## **1.1. Determinación de la pauta de inmunosupresión**

Tal y como se ha explicado previamente en la introducción, se han descrito en la literatura diversos tratamientos inmunosupresores con objeto de favorecer la supervivencia de xenotrasplantes intracerebrales. Mayoritariamente se emplea la CsA, en concentraciones que se sitúan en el rango de 10-30 mg/kg; y, con frecuencia, se utiliza además el glucocorticoide prednisolona, a dosis entre 2-20 mg/kg (veáse punto 3 de introducción), ambos con administración tanto i.p. como s.c. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos han sido llevados a cabo en periodos cortos de tiempo, llegando como máximo a los 2 meses. La falta de tratamientos crónicos de inmunosupresión en ratón probablemente se debe al hecho de que es complicado el manejo de estos animales inmunosuprimidos durante largos periodos de tiempo, ya que se incrementa la probabilidad de padecer infecciones, comprometiéndose la supervivencia y bienestar de los animales. Además, en nuestro caso, los animales sufren un estrés adicional por la necesaria administración repetida de la neurotoxina MPTP. Por tanto, en el laboratorio existía la necesidad de desarrollar un protocolo inmunosupresor a largo plazo, que permitiera evaluar los efectos antiparkinsonianos de los xenotrasplantes de CC en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP (Muñoz-Manchado y col., 2016). En este sentido, dicho protocolo tendría que garantizar la integridad del trasplante y la supervivencia del animal receptor durante un tiempo de entre 3 y 5 meses, dependiendo del diseño experimental. Con estas premisas, se abordó el desarrollo de una pauta de administración de inmunosupresores que minimizara el número de inyecciones. Para ello, basándonos en las publicaciones antes descritas, se analizaron 3 protocolos diferentes en los que se utilizaban inyecciones s.c. independientes de CsA a 15mg/kg y prednisolona a 20 mg/kg durante las 5 semanas que se mantuvieron los trasplantes; con una dosis de CsA 2-4 h previa al implante continuando con la pauta el día siguiente (Figura 17). Estos protocolos fueron los siguientes: i) Tratamiento Severo (inyecciones diarias de CsA y Pred), ii) Tratamiento Intermedio (inyecciones diarias de CsA y prednisolona durante las 3 primeras semanas, y en las dos semanas restantes se administran CsA o prednisolona en días alternos), y iii) Tratamiento Leve (inyecciones diarias de CsA y prednisolona durante las 2 primeras semanas, en la tercera semana se administran CsA o prednisolona en días alternos, y las dos semanas restantes se inyecta CsA 3 veces por semana).



**Figura 17. Esquema de los diferentes protocolos de inmunosupresión.** A. Tratamiento *Severo*. B. Tratamiento *Intermedio*. C. Tratamiento *Leve*. Se indican los momentos del trasplante y sacrificio, así como el rango temporal. En distintos colores se representan las diferentes pautas de administración: Rojo, inyecciones diarias independientes de Ciclosporina A (CsA) y Prednisolona (Pred); Azul, inyección de CsA o Pred en días alternos; Verde, inyección de CsA 3 veces por semana. En todos los casos las inyecciones son subcutáneas (s.c.) y a concentraciones de 15 mg/kg para CsA y de 20 mg/kg para Pred.

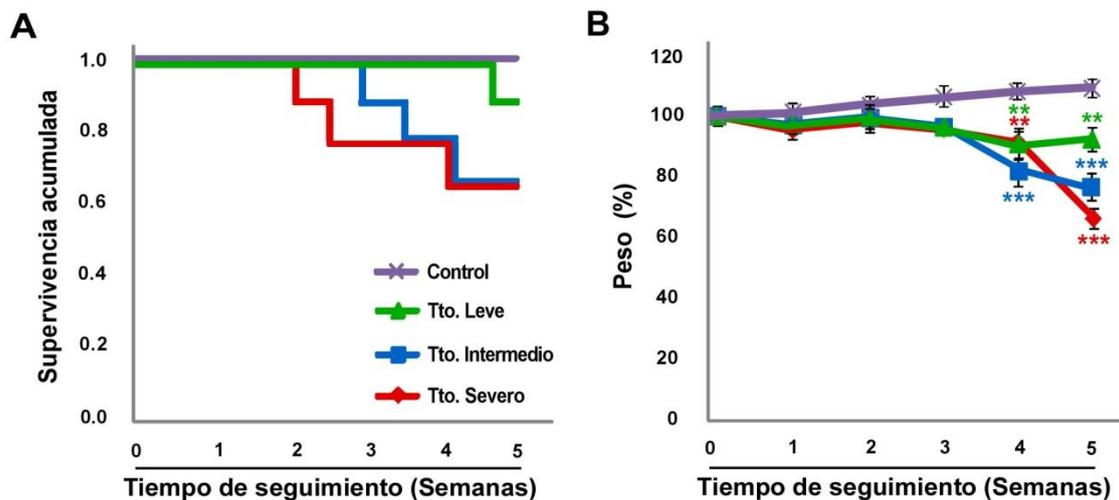
### 1.1.1. Supervivencia y estado general de los animales inmunosuprimidos

Establecidos los protocolos de inmunosupresión, se procedió a analizar el efecto de los mismos sobre la supervivencia y el peso de los animales durante las 5 semanas de tratamiento. Para ello se realizaron xenotrasplantes de CC de rata en ratón (n=9 para cada caso), y como controles se trataron animales con la solución vehículo (*veh*; 25% Etanol en solución salina; n=11). Los animales fueron supervisados diariamente con control cuantitativo de peso y cualitativo del estado general (aspecto, motilidad e ingesta).

Como se muestra en la figura 18A, durante las dos primeras semanas no se compromete la supervivencia de los animales trasplantados y tratados con los diferentes protocolos. Sin embargo, a partir de la 3ª semana se afecta la supervivencia del grupo sometido al tratamiento inmunosupresor severo (8/9, animales vivos/animales iniciales), la cual disminuyó en la 4ª y 5ª semana (6/9). El tratamiento inmunosupresor intermedio, mostró una supervivencia similar con mortalidad a partir de la 4ª semana (8/9 en la 4ª semana; 6/9 en la 5ª semana). En cambio, en los animales sometidos al tratamiento inmunosupresor leve sólo se observó un deceso (8/9) y ninguno en el grupo control (11/11).

Tras el análisis de los pesos de los ratones trasplantados e inmunodeprimidos (Figura 18B), se observó una disminución paulatina en todos los grupos experimentales durante las 4 primeras semanas de tratamiento. No obstante, a partir de la 4ª semana los ratones sometidos al tratamiento leve aumentaron ligeramente de peso (2,31% del peso medio de la semana anterior), mientras que los animales sometidos a tratamiento intermedio o severo sufrieron una caída drástica (respectivamente, -6,14% y -24,65% del peso medio de la semana anterior). En el caso de los controles, los animales experimentan el normal incremento de peso con el tiempo.

Además de los datos cuantitativos antes mencionados, cualitativamente también se observó que numerosos animales tratados con el protocolo inmunosupresor severo o intermedio disminuyeron su actividad locomotora y la ingesta de comida y agua. De hecho, en estos casos, se colocaban hidrogel y pienso dentro de la jaula para favorecer la alimentación e hidratación de los ratones. En ningún caso, fue necesario adoptar estas medidas para los animales sometidos al tratamiento leve.



**Figura 18. Supervivencia y peso de los ratones trasplantados con CC de rata sometidos a los diferentes tratamientos inmunosupresores.** **A.** Curvas de Kaplan Meier mostrando la probabilidad de supervivencia de los ratones con xenotrasplantes de CC de rata tratados con los distintos protocolos de inmunosupresión, o con el vehículo durante las 5 semanas de tratamiento. **B.** Peso medio semanal de los mismos animales que en A, expresado como el porcentaje respecto al peso de cada grupo al inicio del tratamiento. Nótese como en los tratamientos severo e intermedio tanto la supervivencia (A) como el peso (B), sufre una drástica caída al final del mismo, a diferencia de los sometidos a tratamiento leve, los cuales se estabilizan y aumentan ligeramente de peso en la última semana. En distintos colores se representan los diferentes protocolos de inmunosupresión: Morado, vehículo (control); Verde, tratamiento leve (Tto. Leve); Azul, tratamiento intermedio (Tto. Intermedio); Rojo, tratamiento severo (Tto. Severo). (Al inicio del tratamiento inmunosupresor: Vehículo, n=11; Tto. Severo, Intermedio y Leve, n=9; Tras finalizar el tratamiento inmunosupresor: Vehículo, n=11; Tto. Severo e Intermedio, n=6; Tto. Leve, n=8). \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001, ANOVA.

### 1.1.2. Estudio de los linfocitos T en los animales inmunosuprimidos

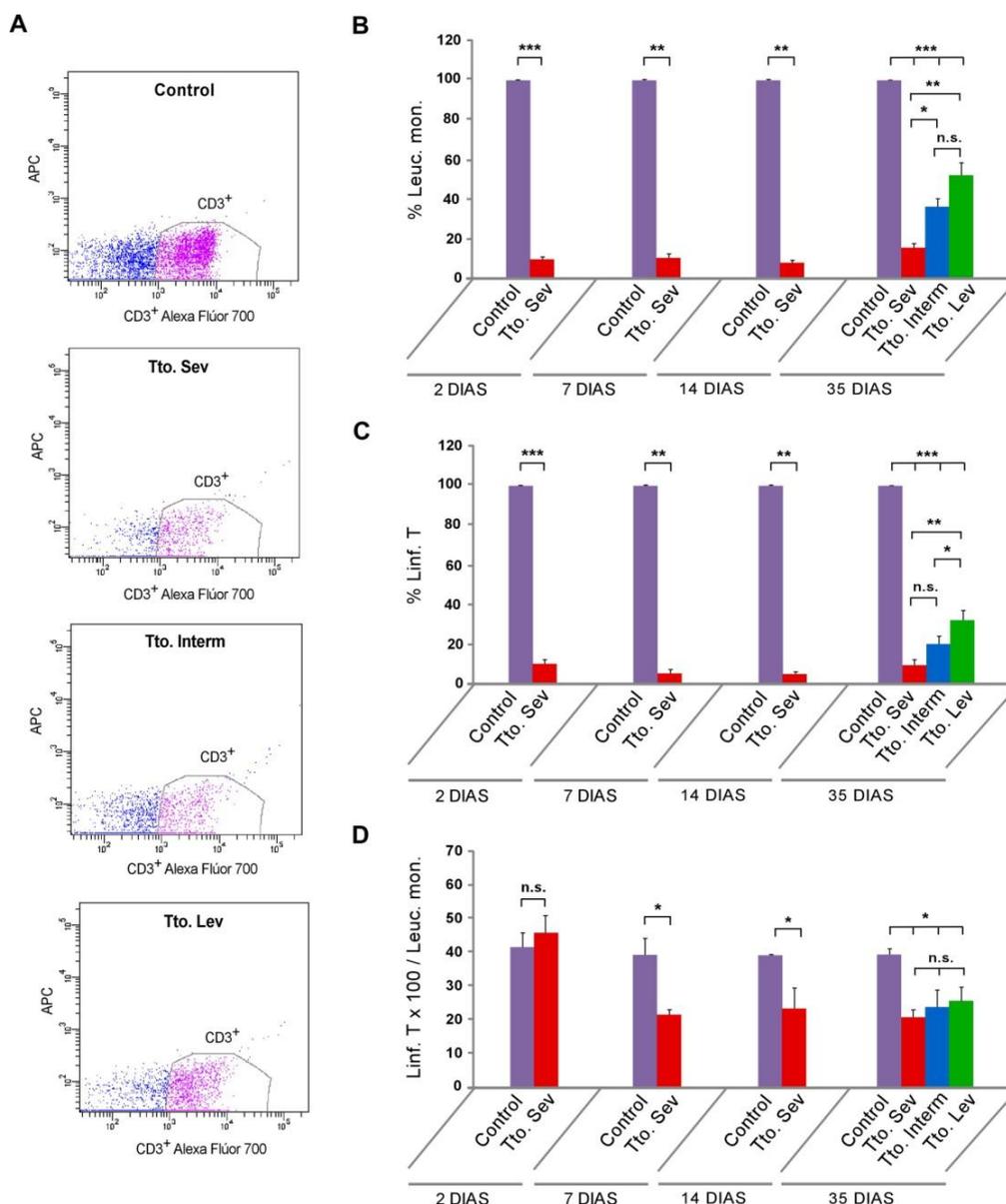
Aunque queda fuera del objeto de esta tesis el análisis detallado de la respuesta inmune a las diferentes pautas de inmunosupresión; para objetivar algún marcador biológico de la acción de los inmunosupresores, especialmente la CsA, se procedió a estudiar mediante citometría de flujo la población de linfocitos T (identificados como CD3<sup>+</sup>; Figura 19). Dentro de los mismos se analizaron también las subpoblaciones linfocitarias T “Helper” (identificados como CD4<sup>+</sup>) y T citotóxicos (identificados como CD8<sup>+</sup>), ver Figura 20. Todos los ensayos se realizaron a partir de muestras de sangre periférica de los ratones xenotrasplantados y tratados con los distintos protocolos inmunosupresores, vehículo (control), y de los animales no tratados (n=3 para cada caso). Debido a que no existían diferencias significativas entre los animales tratados con vehículo y los no tratados, en las representaciones gráficas se muestra como control el valor medio de los porcentajes linfocitarios de los animales con vehículo. El estudio se realizó a distintos periodos de tiempo 2, 7, 14 días (en los que el protocolo inmunosupresor es común para los 3 tratamientos: severo, intermedio y leve) y a los 35 días cuando los 3 protocolos inmunosupresores son diferentes (Figuras 19 y 20).

Respecto al análisis de la población linfocitaria T dentro de la muestra monocítica aislada, en la Figura 19A se muestran cuatro “dot plots” de citometría representativos de los diferentes tratamientos inmunosupresores a los 35 días. La cuantificación de los datos obtenidos por citometría muestra como el tratamiento inmunosupresor severo propicia una importante caída del número total de leucocitos mononucleares (Figura 19B). Esta disminución ocurre desde el inicio del tratamiento ( $8,92 \pm 1,12\%$  del control a los 2 días), y se mantiene durante los 7 y 14 días (respectivamente  $9,22 \pm 1,74\%$  y  $7,17 \pm 0,79\%$ ). A los 35 días de tratamiento la disminución de leucocitos mononucleares sigue siendo significativa aunque algo menor ( $14,8 \pm 1,77\%$ ), este decremento se hace menos ostensible en el caso de los tratamientos inmunosupresores más suaves ( $35,71 \pm 3,89\%$  en el tratamiento intermedio y  $51,20 \pm 5,98\%$  en el tratamiento leve). El curso temporal y porcentajes de disminución de los linfocitos T por la inmunosupresión (Figura 19C) es casi superponible al anteriormente descrito para el total de leucocitos mononucleares. Alcanzado con el tratamiento severo unos valores respecto al control de  $10,15 \pm 1,92\%$  (2 días);  $4,96 \pm 0,78\%$  (7 días);  $4,43 \pm 1,05\%$  (14 días) y  $9,43 \pm 2,24\%$  (35 días). Del mismo modo, los linfocitos T en los animales sometidos a

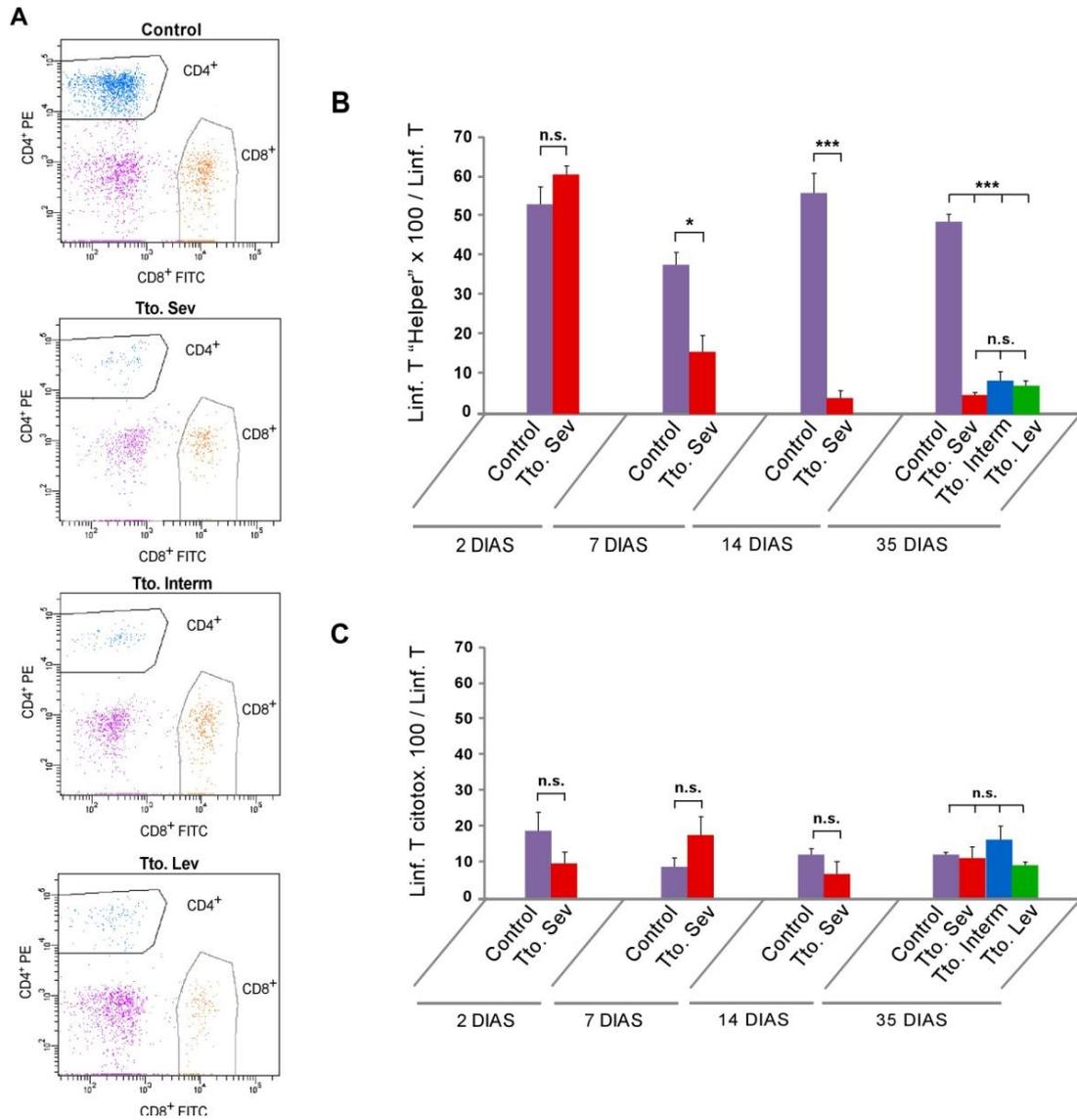
inmunosupresión intermedia y leve, no decrecen tanto (respectivamente  $19,75 \pm 3,71\%$  y  $31,87 \pm 4,56\%$ ; Figura 19C).

Además se analizó si el porcentaje de linfocitos T respecto a los leucocitos mononucleares aislados varía con el tratamiento inmunosupresor (Figura 19D). Al inicio del procedimiento experimental (2 días) no se observan diferencias entre el porcentaje linfocitario T de los animales controles e inmunosuprimidos (respectivamente  $38,1 \pm 4,07\%$  y  $45,36 \pm 5,27\%$  de total). No obstante, a partir de los 7 días de tratamiento, los datos reflejan una disminución significativa del porcentaje de linfocitos T en los ratones sometidos a la pauta inmunosupresora severa ( $20,9 \pm 1,25\%$ ). Esta bajada se mantiene tanto a los 14 como a los 35 días (respectivamente  $23,96 \pm 5,6\%$  y  $21 \pm 2,08\%$ ). Igualmente, en los animales tratados con las pautas inmunosupresoras intermedia y leve, la bajada linfocitaria es similar no observándose diferencias significativas entre las mismas (respectivamente  $23,7 \pm 4,97\%$  y  $25,4 \pm 3,93\%$ ; Figura 19D).

Por otro lado, tal y como se indica en la Figura 20B, no se observaron diferencias entre el porcentaje de linfocitos T "Helper" de los animales controles y los sometidos a inmunosupresión severa tras 2 días de tratamiento (respectivamente  $53,13 \pm 2,27\%$  y  $60,76 \pm 0,94\%$  del total de linfocitos T). Sin embargo, los datos reflejan una reducción significativa de este porcentaje tras 7 días de tratamiento inmunosupresor ( $14,53 \pm 5,34\%$ ), siendo aún más drástica dicha caída a los 14 días ( $3,67 \pm 1,30\%$ ). Finalizados los 35 días de tratamiento, en los animales sometidos a los protocolos de inmunosupresión ya diferenciados (severo, intermedio y leve), se mantuvo la acusada bajada del porcentaje de linfocitos "Helper", aunque tanto en aquellos con tratamiento intermedio como con el leve se mostraron niveles superiores (respectivamente  $9,23 \pm 1,03\%$ ;  $7,43 \pm 1,76\%$ ), a los observados en los animales sometidos al tratamiento severo ( $4,83 \pm 0,37\%$ ). En contraste con los datos obtenidos sobre los linfocitos T "Helper", al analizar el porcentaje de linfocitos T citotóxicos no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales a los distintos tiempos estudiados (Figura 20C).



**Figura 19. Análisis mediante citometría de flujo de los leucocitos mononucleares y de los linfocitos T en los ratones trasplantados con CC de rata y tratados con los distintos protocolos de inmunosupresión. A.** “Dot plots” de citometría representativos de los leucocitos mononucleares aislados (Leuc. mon.), de entre los mismos se indican los linfocitos T (Linf. T; señalados en morado), a partir de muestras de sangre periférica de los animales xenotrasplantados y sometidos durante 35 días a tratamiento con vehículo (controles), y con las diferentes pautas de inmunosupresión: Tratamiento Severo (Tto. Sev); Tratamiento Intermedio (Tto. Interm); y Tratamiento leve (Tto. Lev). Los Linf. T se identificaron con el anticuerpo anti-CD3<sup>+</sup> conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 700, cuya intensidad de fluorescencia se representa en el eje de abscisas. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de la señal fluorescente de la alofocianina (APC; cuyo espectro de emisión es a 620 nm), la cual es neutra, ya que las células sólo se marcaron con Alexa-700, y el leve marcaje obtenido con APC se debe a la propia autofluorescencia de las células. **B y C.** Porcentaje de los leuc. mon. (B) y de los Linf. T (C) respecto al control, tras 2, 7, 14 y 35 días de tratamiento en los animales xenotrasplantados sometidos a la administración de vehículo (controles., Morado), y de las diferentes pautas inmunosupresoras: Tto. Sev (Rojo); Tto. Interm (Azul); y Tto. Lev (Verde). **D.** Porcentaje de Linf. T respecto a los leuc. mon., tras 2, 7, 14 y 35 días de tratamiento en los mismos grupos animales mostrados en B y C. En cada caso n=3; n.s.= no significativo; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001, t-student a los 2, 7 y 14 días y ANOVA a los 35 días.



**Figura 20. Análisis mediante citometría de flujo de los linfocitos T "Helper" y citotóxicos en los ratones trasplantados con CC de rata y tratados con los distintos protocolos de inmunosupresión.**

**A.** "Dot plots" de citometría representativos de las células "Helper" (mostradas en azul) y citotóxicas (citotox.; indicadas en naranja) respecto a la población linfocitaria T (Linf. T) total, a partir de muestras de sangre periférica de los animales xenotrasplantados y tratados durante 35 días con vehículo (controles), y con las diferentes pautas de inmunosupresión: Tratamiento Severo (Tto. Sev); Tratamiento Intermedio (Tto. Interm); y Tratamiento Leve (Tto. Lev). Los Linf. T "Helper" se identificaron con el anticuerpo anti-CD4<sup>+</sup> conjugado con el fluoróforo ficoeritrina (PE) representando la intensidad de fluorescencia del mismo en el eje de ordenadas; y los Linf. T citotox. con el anticuerpo anti-CD8<sup>+</sup> conjugado con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) cuya intensidad de fluorescencia se representa en el eje de abcisas. **B y C.** Porcentaje de Linf. T "Helper" (B) y citotox. (C) respecto a los Linf. T totales tras 2, 7, 14 y 35 días de tratamiento, en los animales xenotrasplantados sometidos a la administración de vehículo (controles., Morado), y de las diferentes pautas inmunosupresoras: Tto. Sev (Rojo); Tto. Interm (Azul); y Tto. Lev (Verde). En cada caso n=3; n.s.= no significativo; \* p< 0,05; \*\*\* p< 0,001, t-student a los 2, 7 y 14 días y ANOVA a los 35 días.

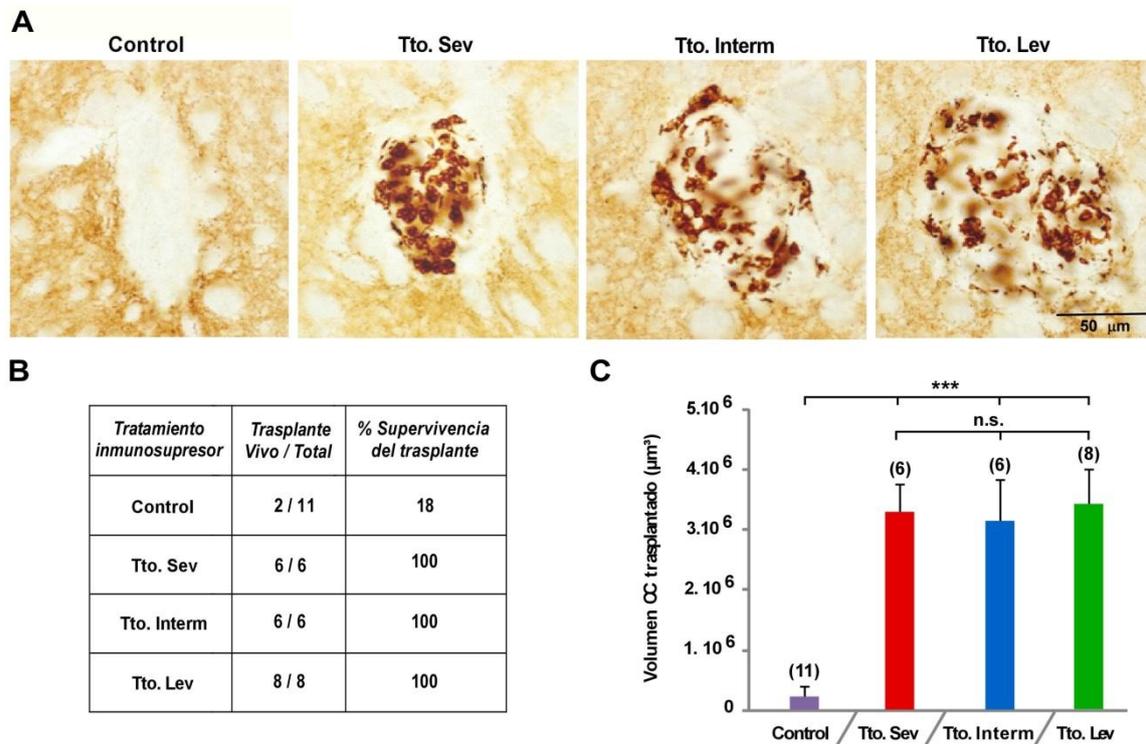
### **1.1.3. Supervivencia de los xenotrasplantes intraestriatales de CC en los animales inmunosuprimidos**

Una vez analizadas la supervivencia y bienestar animal, y la población linfocitaria T de los ratones inmunosuprimidos y trasplantados con CC de rata, se procedió a estudiar la supervivencia de estos xenoimplantes en cada una de las diferentes pautas inmunosupresoras (severa, intermedia y leve; Figura 21). Para ello, tras la realización de los xenotrasplantes, los ratones fueron sometidos a los distintos tratamientos de inmunosupresión durante 5 semanas (n=6 para los animales con el tratamiento inmunosupresor severo e intermedio; y n=8 para aquellos sometidos a tratamiento leve). Como controles se trataron animales con la solución vehículo (n=11). Tras la finalización del periodo experimental, se realizó el correspondiente procesado histológico de los cerebros mediante inmunohistoquímica para TH, con objeto de marcar a las células glómicas o tipo I del CC.

Tal y como se muestra en la Figura 21A, se observó que el CC trasplantado en los animales controles había sido rechazado en la mayoría de los casos (2/11, trasplantes vivos/trasplantes totales), mientras que en aquellos sometidos a los diferentes protocolos de inmunosupresión el xenotrasplante carotídeo sobrevivía en todos los animales analizados (6/6, en ratones trasplantados con tratamiento severo e intermedio; y 8/8, en ratones trasplantados con tratamiento leve). Además, los xenoimplantes de los animales inmunosuprimidos presentaban el característico fenotipo del CC, con numerosos glomérulos de células TH<sup>+</sup>, lo que indicaba la correcta integridad del tejido. Con objeto de determinar si existían diferencias cuantitativas en la supervivencia del xenoimplante entre los 3 protocolos inmunosupresores, se llevó a cabo el análisis estereológico del CC trasplantado, obteniendo volúmenes similares del xenotrasplante entre los distintos tratamientos, y sólo siendo significativa la diferencia del volumen del CC trasplantado de los 3 protocolos respecto al del control (Figura 21C).

En base a la supervivencia de los ratones trasplantados e inmunosuprimidos y la ausencia de rechazo del trasplante, se eligió el protocolo de inmunosupresión leve como el más adecuado para estudiar los efectos de los xenotrasplantes de CC en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP (Muñoz-Manchado y col., 2016), ya que es el que proporciona una mejor supervivencia del animal receptor sin rechazo del xenotrasplante a largo plazo. Por ello, de aquí en adelante en esta tesis cuando se

mencione la inmunosupresión de los animales nos referiremos al tratamiento de inmunosupresión leve.



**Figura 21. Xenotrasplantes intraestriatales de CC de rata en ratones sometidos a los diferentes tratamientos de inmunosupresión.** **A.** Microfotografías representativas de cortes coronales de estriado teñidos mediante inmunohistoquímica de TH, mostrando los xenotrasplantes intraestriatales de CC de los animales trasplantados y tratados con vehículo (control), y con los distintos protocolos de inmunosupresión durante 5 semanas desde el implante: Tratamiento Severo (Tto. Sev); Tratamiento Intermedio (Tto. Interm); y Tratamiento Leve (Tto. Lev). **B y C.** Análisis de la supervivencia del xenotrasplante (B) y del volumen del CC implantado ( $\mu\text{m}^3$ ; C) en los mismos animales mostrados en A. En distintos colores se representan los diferentes protocolos de inmunosupresión: Morado, control; Rojo, Tto. Sev; Azul, Tto. Interm y Verde, Tto. Lev. Entre paréntesis el número de animales de cada grupo. n.s.= no significativo; \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA.

## 2. Análisis del efecto de la inmunosupresión en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP

Establecido el protocolo inmunosupresor leve como el más indicado para nuestro abordaje experimental, se procedió a evaluar los posibles efectos que éste pudiera tener sobre la degeneración de la vía nigroestriatal inducida por el neurotóxico MPTP en el modelo animal crónico de parkinsonismo (Muñoz-Manchado y col., 2016). Para ello, además del tratamiento de inmunosupresión leve (véase punto 1.1 y Figura 17 de Resultados) se procedió a la intoxicación por MPTP. A partir de la cuarta semana del

inicio de la inmunosupresión, donde sólo se administra CsA (15mg/kg, s.c., 3 veces por semana), se añade el tratamiento con MPTP (20 mg/kg, s.c., también 3 veces por semana en días distintos a la CsA) durante 1, 2 ó 3 meses. Tras 2 días de la finalización de cada tratamiento con MPTP se realiza el sacrificio de los animales para cuantificar el grado de degeneración nigroestriatal. En cada punto temporal, se estudiaron 6 grupos experimentales: 1) Ratones controles del tratamiento inmunosupresor, se les suministra sólo EtOH al 25% en solución salina 3 veces por semana (vIMN, vehículo inmunosupresión). 2) Ratones controles del tratamiento con MPTP, se les suministra sólo solución salina 3 veces por semana (vMPTP, vehículo MPTP). 3) Ratones controles del tratamiento conjunto inmunosupresión y MPTP, se les suministran los vehículos correspondientes en días alternos (vINM-vMPTP). 4) Ratones tratados solo con MPTP 3 veces por semana (MPTP). 5) Ratones tratados con el vehículo de la inmunosupresión y MPTP en días alternos (vINM-MPTP). Y, 6) Ratones inmunosuprimidos y con MPTP en días alternos (INM-MPTP). Esta nomenclatura será utilizada a lo largo de la tesis.

## 2.1. Acciones sobre la vía nigroestriatal dopaminérgica

### 2.1.1. Análisis de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc

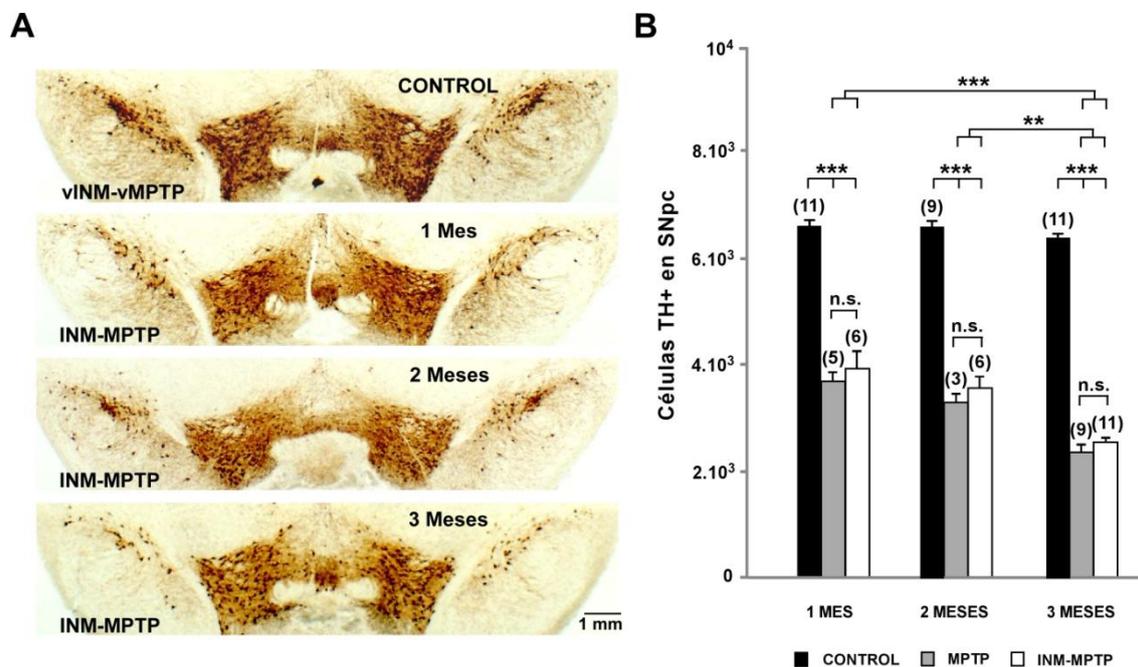
En los diferentes grupos antes explicitados se procedió a la cuantificación estereológica del número de neuronas dopaminérgicas (TH<sup>+</sup>) presentes en la SNpc. Como se muestra en la tabla 4, no se observaron diferencias significativas entre los diversos controles (vMPTP, vINM y vINM-vMPTP), por lo que en las representaciones gráficas y cuantificaciones se consideró como control el valor medio de los 3 grupos en cada periodo de tiempo analizado.

SNpc	1 MES (p=0,937)		2 MESES (p=0,936)		3 MESES (p=0,884)	
	n	Nº Células TH+	n	Nº Células TH+	n	Nº Células TH+
<b>Controles</b>						
vINM	3	6487,94 ± 286,23	3	6512,57 ± 72,47	3	6386,56 ± 83,54
vMPTP	4	6647,65 ± 227,34	3	6613,92 ± 245,94	4	6417,61 ± 237,09
vINM-vMPTP	4	6497,38 ± 81,50	3	6577,77 ± 231,89	4	6310,24 ± 69,37

Tabla 4. Cuantificación estereológica de las neuronas TH<sup>+</sup> de la SNpc de los grupos controles vMPTP, vINM y vINM-vMPTP a los 1, 2, ó 3 meses. Se indican los valores de p (ANOVA) y n.

Tras el análisis estereológico de las secciones mesencefálicas de los animales MPTP y vINM-MPTP, tampoco se obtuvieron diferencias significativas ( $p=0,924$  a 1 mes de tratamiento,  $p=0,716$  a 2 meses de tratamiento, y  $p=0,985$  a 3 meses de tratamiento), de modo que en las representaciones gráficas se muestran sólo los valores del grupo MPTP e INM-MPTP respecto a los controles en cada periodo estudiado.

El grado de lesión dopaminérgica en la SNpc producida por el MPTP no se ve afectada significativamente por el tratamiento inmunosupresor, aunque se aprecia una leve tendencia de menor daño (Figura 22B). En los animales INM-MPTP se obtiene una disminución de las neuronas TH<sup>+</sup> de la SNpc del ~40, 50 y 60% (a 1, 2 ó 3 meses), mientras que en los animales tratados sólo con MPTP estos valores son del ~45, 55 y 65% respectivamente.



**Figura 22. Efecto de la inmunosupresión en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inducida por el MPTP tras 1, 2 ó 3 meses.** A. Inmunohistoquímica de TH en cortes coronales a nivel del mesencéfalo de animales tratados con inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP) a los tiempos indicados, y del control (vINM-vMPTP, 3 meses). B. Análisis estereológico de las células TH<sup>+</sup> de la SNpc de los animales CONTROL, MPTP e INM-MPTP en cada periodo estudiado (1, 2 ó 3 meses de tratamiento). Entre paréntesis el número de animales para cada grupo; n.s.= no significativo; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ , ANOVA.

### 2.1.2. Análisis de la inervación dopaminérgica del estriado

El grado de inervación estriatal dopaminérgica se cuantificó inicialmente mediante medidas de densidad óptica en cortes coronales de estriado marcados inmunohistoquímicamente para TH. Al igual que en el subapartado anterior, en primer

lugar se estudió el grado de inervación dopaminérgica de los animales de los grupos controles (vINM, vMPTP y vINM-vMPTP), no obteniéndose diferencias significativas entre los mismos (ver tabla 5). Por tanto, para las representaciones gráficas y cuantificaciones se consideró como control el valor medio de los 3 grupos en cada periodo de tiempo analizado.

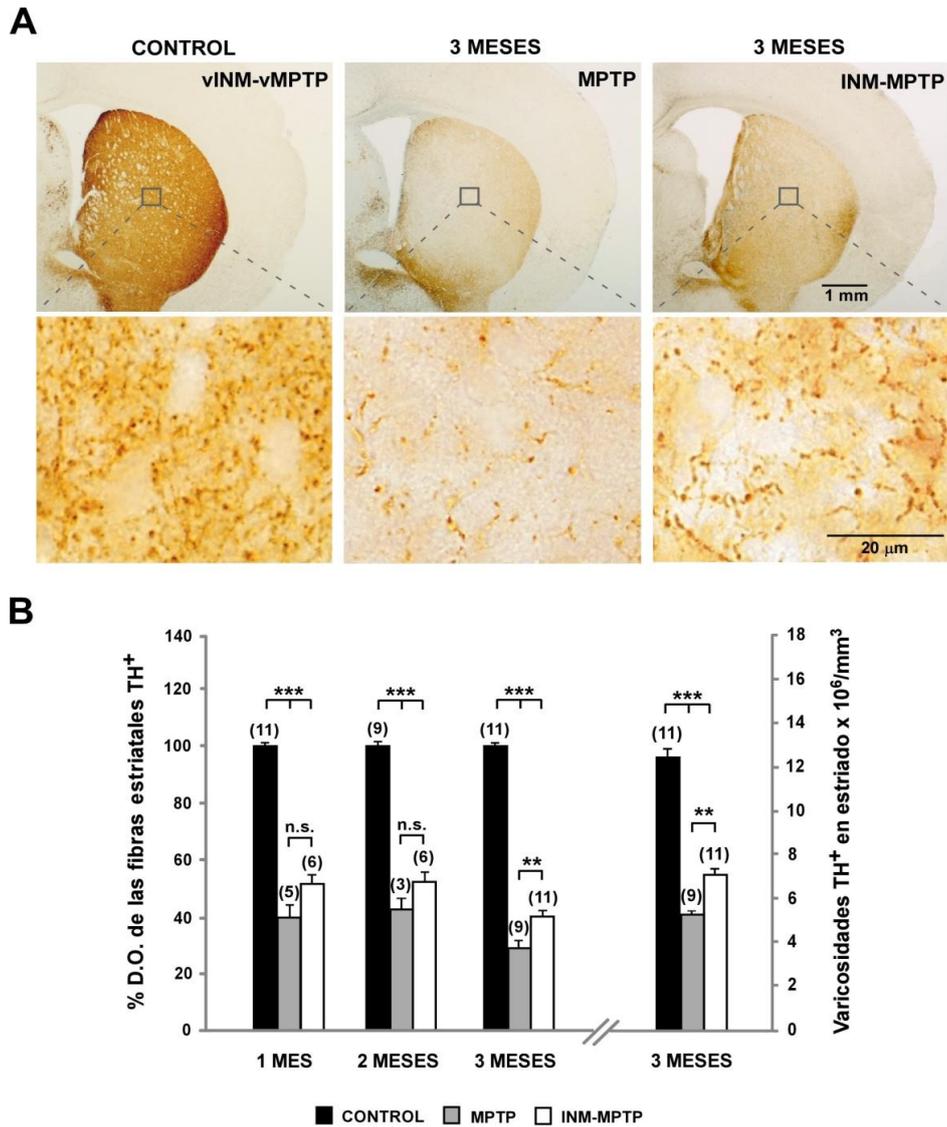
<i>Estriado</i>	1 MES (p=0,980)		2 MESES (p=0,969)		3 MESES (p=0,645)		
	<i>Controles</i>	<i>n</i>	<i>D.O. (u.a.)</i>	<i>n</i>	<i>D.O.(u.a.)</i>	<i>n</i>	<i>D.O.(u.a.)</i>
vINM		3	33,76 ± 1,01	3	36,04 ± 2,42	3	34,53 ± 0,51
vMPTP		4	34,632 ± 1,26	3	35,43 ± 0,28	4	34,09 ± 0,75
vINM-vMPTP		4	34,08 ± 0,83	3	35,53 ± 1,05	4	35,74 ± 0,60

**Tabla 5. Densidad óptica (D.O.) de las fibras estriatales TH<sup>+</sup> (u.a.) en los grupos controles vINM, vMPTP y vINM-vMPTP a los 1, 2, ó 3 meses.** Se indican los valores de p (ANOVA) y n.

Tras el análisis de las medidas densitométricas estriatales de los animales MPTP y vINM-MPTP, no se observaron diferencias significativas entre los mismos (p=0,904 a 1 mes de tratamiento, p=0,361 a 2 meses de tratamiento, y p=0,951 a 3 meses de tratamiento), por lo que en las representaciones gráficas se muestran los valores obtenidos de los grupos MPTP e INM-MPTP respecto a los controles en cada periodo estudiado.

Como se indica en la Figura 23B, se aprecia una pequeña disminución del daño inducido por el MPTP en los terminales dopaminérgicos estriatales de los animales sometidos también al tratamiento inmunosupresor (~60% vs ~50% de daño tras el primer y segundo mes, y ~70% vs ~60% al tercer mes). Este efecto es estadísticamente significativo sólo a los tres meses de tratamiento.

Con objeto de corroborar las diferencias observadas, se realizó una cuantificación estereológica de las varicosidades TH<sup>+</sup> estriatales de los mismos cortes que en el estudio densitométrico, centrándonos ya únicamente en los tres meses (Figura 23B). Efectivamente, se observó un aumento significativo (p<0,01) de varicosidades en el grupo INM-MPTP ( $7,08 \cdot 10^6 \pm 2,86 \cdot 10^5$  varicosidades/mm<sup>3</sup>) en comparación con el grupo MPTP ( $5,22 \cdot 10^6 \pm 1,36 \cdot 10^5$ ).



**Figura 23. Efecto de la inmunosupresión en la denervación estriatal dopaminérgica inducida por el MPTP tras 1, 2 ó 3 meses.** **A.** Microfotografías, de cortes coronales de cerebro a nivel del estriado marcados mediante inmunohistoquímica para TH, de animales tratados durante 3 meses con MPTP (MPTP), inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP), y con el vehículo (vINM-vMPTP; control). En la parte inferior se muestran detalles a mayor amplificación mostrando las varicosidades TH<sup>+</sup>. **B.** Estimación de la inervación estriatal TH<sup>+</sup> por densidad óptica (D.O.) de los animales CONTROL, MPTP e INM-MPTP en cada periodo estudiado (1, 2 ó 3 meses de tratamiento; eje de ordenadas a la izquierda); y cuantificación estereológica de las varicosidades dopaminérgicas estriatales/mm<sup>3</sup> de los mismos animales tras 3 meses de tratamiento (eje de ordenadas a la derecha). Entre paréntesis el número de animales de cada grupo, n.s.= no significativo; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001, ANOVA.

## **2.2. Acciones sobre las poblaciones gliales en SNpc y estriado**

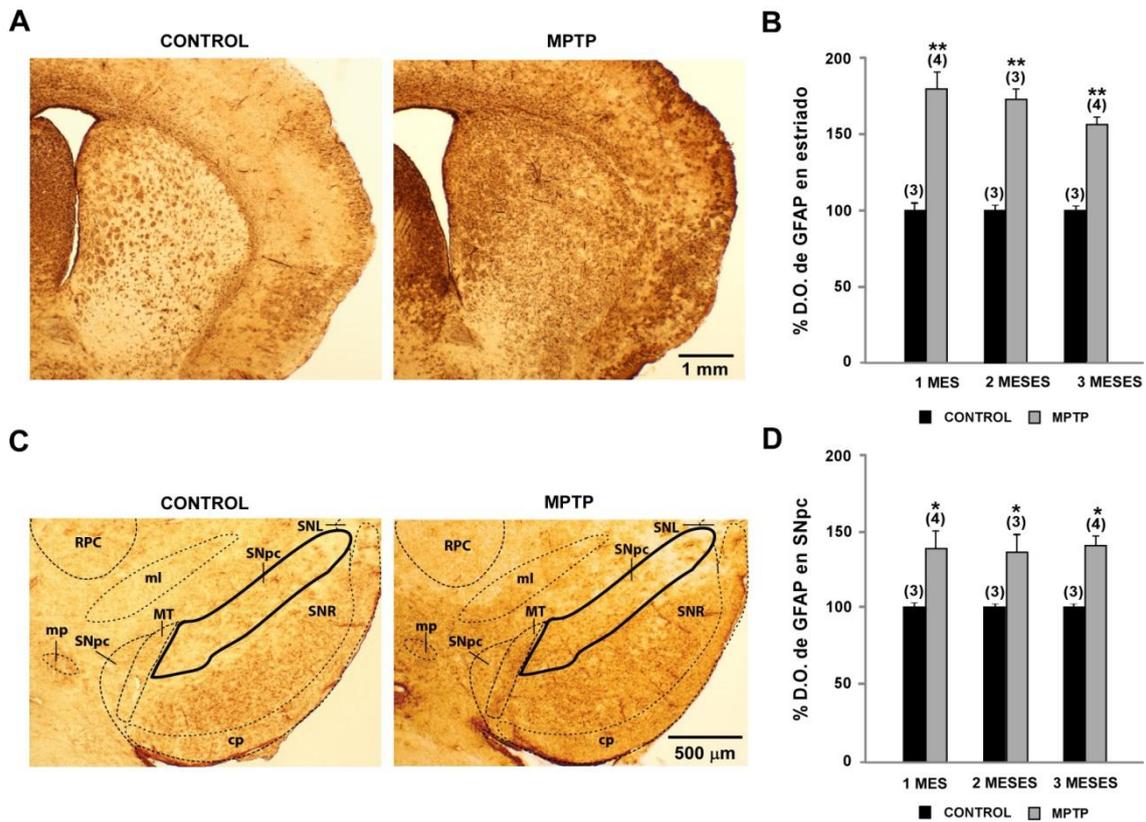
Tal y como se describió con anterioridad (veáse punto 1.3 de Introducción), son muchos los trabajos que muestran una importante implicación de los fenómenos inflamatorios en la EP (revisado en Hirsch y Hunot., 2009 y 2012), entre los que destacan la astrogliosis y la activación microglial. Además, recientemente se ha sugerido un proceso de oligodendroglisis asociado al parkinsonismo experimental (Annesse y col., 2013). Por tanto, se procedió a estudiar posibles variaciones en las poblaciones gliales en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP, así como modificaciones de las mismas por el tratamiento inmunosupresor.

### **2.2.1. En el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP**

#### **2.2.1.1. Astroglía**

El primer fenómeno neuroinflamatorio analizado en el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP fue el grado de astrogliosis, el cual se cuantificó mediante medidas de densidad óptica en cortes coronales de estriado y SNpc teñidos inmunohistoquímicamente para GFAP, marcador de las células gliales astrocitarias.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en la inmunoreactividad de GFAP tanto en SNpc como en estriado tras 1 mes de administración crónica de MPTP (alcanzando un aumento de ~80% en el estriado y de ~40% en SNpc). Esta respuesta astrogliosa se mantuvo en niveles similares tras los diferentes tratamientos efectuados (1, 2 ó 3 meses; Figura 24).

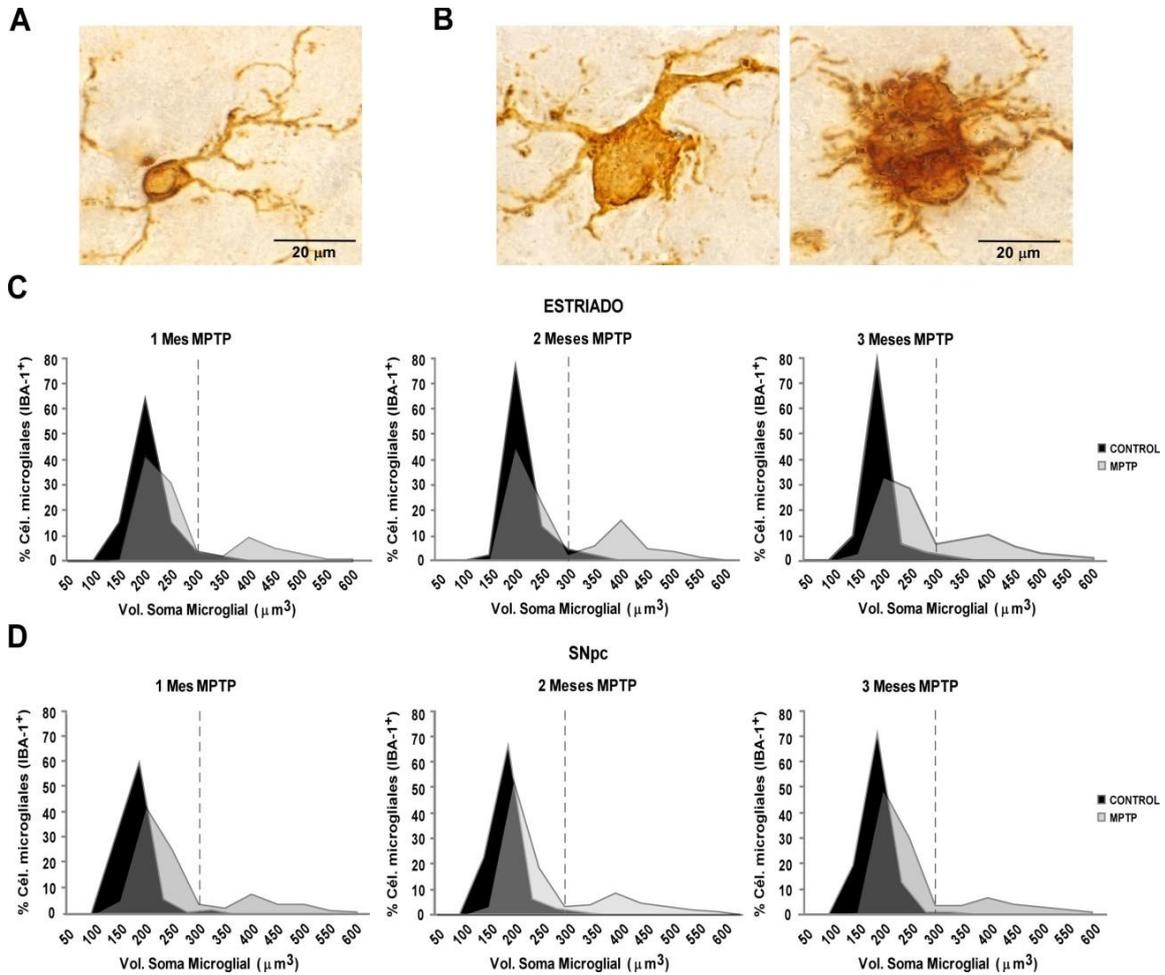


**Figura 24. Reacción astrogial tras 1, 2 ó 3 meses del tratamiento con MPTP.** A y C. Microfotografías, de cortes coronales de cerebro a nivel del estriado (A) y de la SNpc (C) marcados mediante inmunohistoquímica para GFAP, de animales tratados durante 3 meses con MPTP y de su respectivo control. En C se han superpuesto las regiones cerebrales correspondientes al corte mostrado (-3,16 mm respecto a Bregma) según al atlas de Franklin y Paxinos (1997), indicando en línea continua la zona estudiada de la SNpc lateral al MT (núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio). Se señalan también: pedúnculo cerebral (cp), sustancia negra reticular (SNR), sustancia negra lateral (SNL), pedúnculo mamilar (mp), lemnisco medial (ml) y núcleo rojo (RPC). **B y D.** Análisis cuantitativo mediante densidad óptica (D.O.) del grado de tinción GFAP a nivel de estriado (B) y de SNpc (D) de los animales sometidos al mismo tratamiento que en A y C pero tras 1, 2 ó 3 meses. Entre paréntesis el número de animales de cada grupo, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Test t-Student.

### 2.2.1.2. Microglía

La activación microglial fue el siguiente proceso neuroinflamatorio estudiado en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP. Esta reacción microglial, como se ha descrito con anterioridad (veáse apartado 1.3 de Introducción), se caracteriza por cambios morfológicos celulares drásticos. La microglía en reposo presenta un soma pequeño y prolongaciones largas y delgadas, al activarse aumenta el tamaño del soma y exhibe prolongaciones más cortas y gruesas (Kettenmann y col., 2011). Como paso previo al análisis de la activación microglial, se visualizaron al microscopio las secciones de estriado y SNpc teñidas mediante inmunohistoquímica con el marcador general de microglía IBA-1. Como resultado se observó que los cortes cerebrales de los

animales controles presentaban muy pocas células IBA-1<sup>+</sup> con la típica morfología de microglía activa (Figura 25A). En cambio, los correspondientes a los animales tratados con MPTP mostraban un claro aumento de células IBA-1<sup>+</sup> con morfología característica activa (Figura 25B).

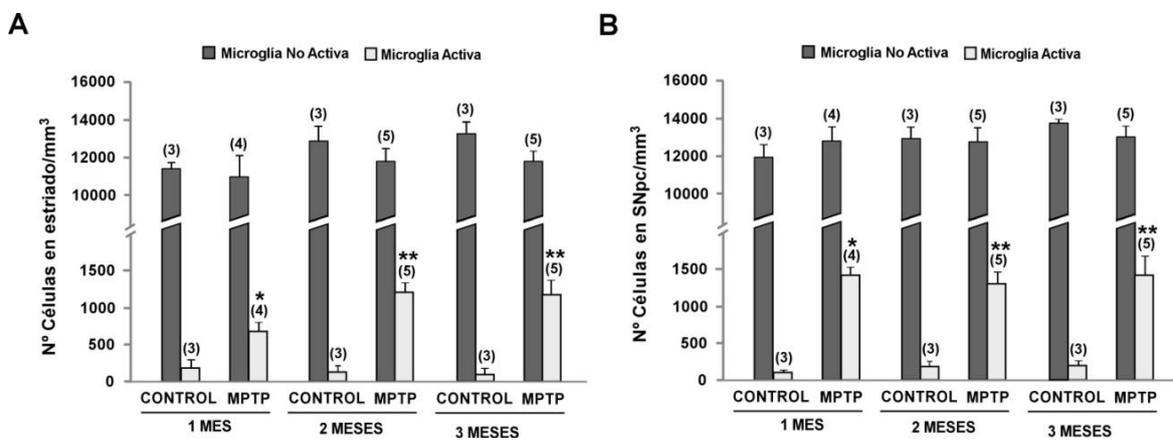


**Figura 25. Morfología de las células microgliales y cuantificación estereológica del volumen del soma de las mismas tras 1, 2 ó 3 meses del tratamiento con MPTP. A y B.** Microfotografías de cortes de estriado marcados mediante inmunohistoquímica IBA-1, mostrando la morfología característica de una célula microglial no activa de un animal control (~150 μm<sup>3</sup> de volumen del soma; A), y de dos ejemplos de morfología microglial activa en los animales tratados con MPTP (~400 y 525 μm<sup>3</sup> de volumen del soma respectivamente; B). **C y D.** Histogramas representando el porcentaje de células (Cél.) microgliales (IBA-1<sup>+</sup>) en cada intervalo (área) según el volumen (Vol.) del soma en el estriado (C) y SNpc (D) de los animales MPTP y sus respectivos controles tras 1, 2 ó 3 meses de tratamiento. La línea gris punteada indica el volumen del soma (300 μm<sup>3</sup>) por encima del cual se considera microglía activa.

Debido a los cambios cualitativos advertidos en la morfología microglial, nos propusimos definir un sistema de medida objetivo que diferenciara la microglía activa de la no activa. Para ello, se cuantificó estereológicamente el volumen del soma

microglial del estriado y SNpc de los animales controles y MPTP tras 1, 2 ó 3 meses de tratamiento. Como se muestra en la Figura 25C y D, se aprecia la existencia de dos poblaciones microgliales en función del volumen del soma, tanto en el estriado como en la SNpc de los animales MPTP. Por un lado, se obtienen células IBA-1<sup>+</sup> con un volumen de soma de entre ~100-300  $\mu\text{m}^3$  que cumplen con los parámetros morfológicos de microglía no activa. Por otro lado, se detectan células IBA-1<sup>+</sup> con un volumen de soma de entre ~300-600  $\mu\text{m}^3$ , las cuales se corresponden con una morfología activa, y que aparecen mayoritariamente en los animales MPTP. A partir de estos resultados se determinó considerar microglía activa toda aquella célula IBA-1<sup>+</sup> con volumen de soma  $\geq 300 \mu\text{m}^3$ , criterio que se aplicará en los siguientes estudios microgliales realizados en esta tesis doctoral.

Se procedió entonces a realizar el análisis de la activación microglial en respuesta al tratamiento con MPTP mediante la cuantificación estereológica del número de células IBA-1<sup>+</sup> no activas y activas/ $\text{mm}^3$ . Los resultados muestran un incremento significativo (próximo al 10%) en la densidad de la microglía activa desde el primer mes de tratamiento con MPTP, tanto en el estriado como en la SNpc (Figura 26).

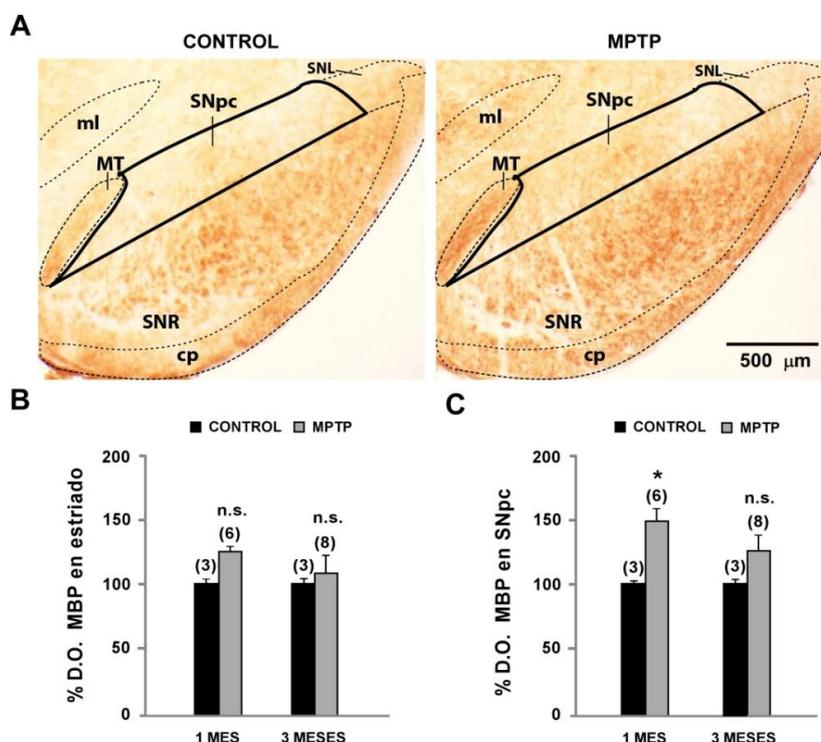


**Figura 26. Activación microglial tras 1, 2 ó 3 meses de tratamiento con MPTP. A y B.** Cuantificación estereológica de la densidad de microglía no activa y activa en estriado (A) y SNpc (B) de los animales controles y MPTP tras 1, 2 ó 3 meses de tratamiento. Entre paréntesis el número de animales de cada grupo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Test t-Student.

### 2.2.1.3. Oligodendroglía

Para finalizar el estudio de los parámetros neuroinflamatorios en los ratones tratados con MPTP y en los respectivos controles, analizamos el grado de oligodendrogliosis al comienzo (1 mes) y al final del tratamiento neurotóxico (3 meses). Como marcador

inmunohistoquímico de oligodendrocitos se utilizó la MBP en cortes coronales a nivel de estriado y SNpc, que fueron posteriormente sometidos al análisis densitométrico. Como resultado se obtuvo una clara tendencia hacia la oligodendrogliosis en todos los supuestos estudiados, aunque sólo es estadísticamente significativa en la SNpc al mes del tratamiento con MPTP (Figura 27).



**Figura 27. Análisis de la oligodendrogliosis tras 1 y 3 meses de tratamiento con MPTP. A.** Microfotografías de cortes coronales de cerebro a nivel de la SNpc marcados inmunohistoquímicamente para MBP, de animales tratados con MPTP durante 1 mes, y de su respectivo control. Se indica la superposición de las regiones cerebrales correspondientes al corte mostrado (-3,16 mm respecto a Bregma) según al atlas de Franklin y Paxinos (1997), señalando en línea continua la zona estudiada de la SNpc lateral al MT (núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio). Se señalan también: pedúnculo cerebral (cp), sustancia negra reticular (SNR), sustancia negra lateral (SNL), pedúnculo mamilar (mp), lemnisco medial (ml) y núcleo rojo (RPC). **B y C.** Cuantificación mediante densitometría óptica (D.O.) de la tinción MBP en el estriado (B) y SNpc (C) de los animales controles y MPTP tras 1 ó 3 meses de tratamiento neurotóxico. Entre paréntesis el número de animales de cada grupo. n.s.= no significativo; \*  $p < 0,05$ ; Test t-Student.

### 2.2.2. En el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP sometido al tratamiento inmunosupresor

Los resultados descritos anteriormente indican un estado de neuroinflamación en el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP. A continuación, se analiza el efecto del tratamiento inmunosupresor sobre la activación astrogial y microglial generada por el neurotóxico.

### 2.2.2.1. Astrogli a

Del mismo modo que se realizó el estudio de la población astrogli al en los animales tratados con MPTP (ve ase punto 2.2.1.1. de Resultados), se procedió a analizar el efecto del tratamiento inmunosupresor sobre la activación astrocitaria observada. Para ello, se cuantificó el grado de astrogliosis mediante medidas de densidad óptica en cortes coronales de estriado y SNpc teñidos inmunohistoquímicamente para GFAP de los animales MPTP, vINM-MPTP e INM-MPTP y sus respectivos controles (vMPTP, vINM y vINM-vMPTP). Como se indica en la tabla 6, no se observaron diferencias significativas entre los diversos controles, por lo que en las representaciones gráficas y cuantificaciones se consideró como control el valor medio de los 3 grupos en cada periodo de tiempo analizado.

<i>Estriado</i>	<b>1 MES</b> (p=0,926)		<b>2 MESES</b> (p=0,829)		<b>3 MESES</b> (p=0,998)	
<i>Controles</i>	<b>n</b>	<b>D.O. GFAP<sup>+</sup> (u.a.)</b>	<b>n</b>	<b>D.O. GFAP<sup>+</sup> (u.a.)</b>	<b>n</b>	<b>D.O. GFAP<sup>+</sup> (u.a.)</b>
vINM	3	41,63 ± 2,75	3	40,29 ± 2,81	3	46,47 ± 0,38
vMPTP	3	39,89 ± 6,65	3	41,56 ± 1,82	3	46,52 ± 1,97
vINM-vMPTP	3	38,54 ± 8,04	3	40,25 ± 2,06	3	46,63 ± 2,59

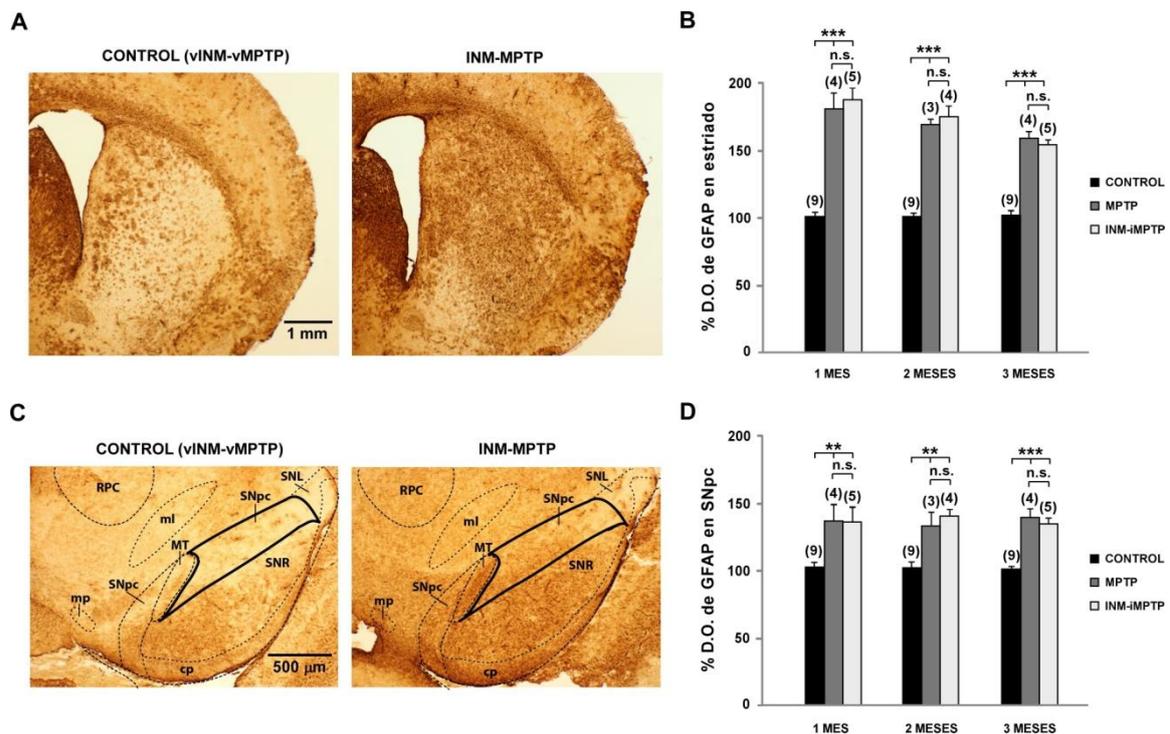
  

<i>SNpc</i>	<b>1 MES</b> (p=0,735)		<b>2 MESES</b> (p=0,645)		<b>3 MESES</b> (p=0,627)	
<i>Controles</i>	<b>n</b>	<b>D.O. GFAP<sup>+</sup> (u.a.)</b>	<b>n</b>	<b>D.O. GFAP<sup>+</sup> (u.a.)</b>	<b>n</b>	<b>D.O. GFAP<sup>+</sup> (u.a.)</b>
vINM	3	55,90 ± 3,04	3	51,38 ± 3,39	3	60,83 ± 0,16
vMPTP	3	53,19 ± 1,68	3	47,66 ± 0,87	3	58,17 ± 0,99
vINM-vMPTP	3	57,37 ± 8,03	3	54,24 ± 7,90	3	58,41 ± 0,64

**Tabla 6.** Astrogliosis en cortes coronales de estriado y SNpc. Se cuantifica la densidad  ptica (D.O.) tras la inmunohistoquímica para GFAP en los grupos controles vINM, vMPTP y vINM-vMPTP a los 1, 2,   3 meses. Se indican los valores de p (ANOVA) y n.

Tras el estudio de las medidas densitométricas estriatales y de la SNpc GFAP<sup>+</sup> de los animales MPTP y vINM-MPTP, no se observaron diferencias significativas entre los mismos (En estriado: p=0,519 a 1 mes de tratamiento, p=0,474 a 2 meses de tratamiento, y p=0,902 a 3 meses de tratamiento; En SNpc: p=0,849 a 1 mes de tratamiento, p=0,463 a 2 meses de tratamiento, y p=0,548 a 3 meses de tratamiento). Debido a ello, en las representaciones gráficas se muestran los valores obtenidos de los grupos MPTP e INM-MPTP respecto a los controles en cada periodo estudiado.

Como se puede apreciar en la Figura 28 los animales INM-MPTP exhiben un incremento significativo en la inmunoreactividad de GFAP tanto en estriado como en SNpc respecto a los controles tras los diferentes periodos de tratamiento (1, 2 ó 3 meses). Estas medidas de densitometría GFAP<sup>+</sup> de los animales INM-MPTP fueron similares a las obtenidas en el grupo MPTP, no observándose diferencias significativas entre los mismos. Por tanto, los resultados indican que el tratamiento inmunosupresor no ejerce ningún efecto sobre la población astrogial en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP.



**Figura 28. Efecto del tratamiento inmunosupresor en la población astrogial del modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP a 1, 2 ó 3 meses.** A y C. Microfotografías, de cortes coronales a nivel del estriado (A) y de la SNpc (C) marcados mediante inmunohistoquímica para GFAP, de animales tratados durante 3 meses con inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP), y con el vehículo (vINM-vMPTP; control). En C se han superpuesto las regiones cerebrales correspondientes al corte mostrado (-3,16 mm respecto a Bregma) según al atlas de Franklin y Paxinos (1997), indicando en línea continua la zona estudiada de la SNpc lateral al MT (núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio). Se señalan también: pedúnculo cerebral (cp), sustancia negra reticular (SNR), sustancia negra lateral (SNL), pedúnculo mamilar (mp), lemnisco medial (ml) y núcleo rojo (RPC). B y D. Análisis cuantitativo mediante densidad óptica (D.O.) del grado de tinción GFAP a nivel de estriado (B) y de la SNpc (D) de los animales CONTROL, MPTP e INM-MPTP en cada periodo estudiado (1, 2 ó 3 meses de tratamiento). Entre paréntesis el número de animales de cada grupo, n.s.= no significativo; \* p< 0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p< 0,001, ANOVA.

### 2.2.2.2. Microglía

Con objeto de analizar el efecto del tratamiento inmunosupresor sobre la activación microglial observada en el modelo crónico de MPTP (veáse apartado 2.2.1.2. de Resultados), tras la inmunohistoquímica con el marcador IBA-1, se procedió a la cuantificación estereológica de la densidad de las células microgliales no activas ( $<300\mu\text{m } \varnothing$ ) y activas ( $>300\mu\text{m } \varnothing$ ) en el estriado y en la SNpc de los grupos animales. Tal y como se muestra en la tabla 7, entre los distintos grupos controles (vMPTP, vINM y vINM-vMPTP) no se observaron diferencias significativas, por lo que en las representaciones gráficas y cuantificaciones se consideró como control el valor medio de los 3 grupos en cada periodo de tiempo analizado.

<b>ESTRIADO</b>	<b>Densidad microglial (Nº Cels/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>vINM</b>	<b>vMPTP</b>	<b>vINM-vMPTP</b>
<b>1 MES (n = 3)</b>	No Activas ( $p = 0,956$ )	11461,61 ± 97,61	11379,06 ± 342,87	11344,55 ± 333,66
	Activas ( $p = 0,694$ )	179,25 ± 47,46	184,702 ± 106,62	169,82 ± 107,62
<b>2 MESES (n = 3)</b>	No Activas ( $p = 0,627$ )	13650,17 ± 703,69	12863,69 ± 843,47	13597,09 ± 438,07
	Activas ( $p = 0,791$ )	61,48 ± 50,26	119,58 ± 83,90	89,61 ± 46,46
<b>3 MESES (n = 3)</b>	No Activas ( $p = 0,829$ )	12740,15 ± 40,21	13268,35 ± 627,64	12911,83 ± 204,64
	Activas ( $p = 0,993$ )	117,56 ± 120,63	89,43 ± 89,54	89,43 ± 89,54

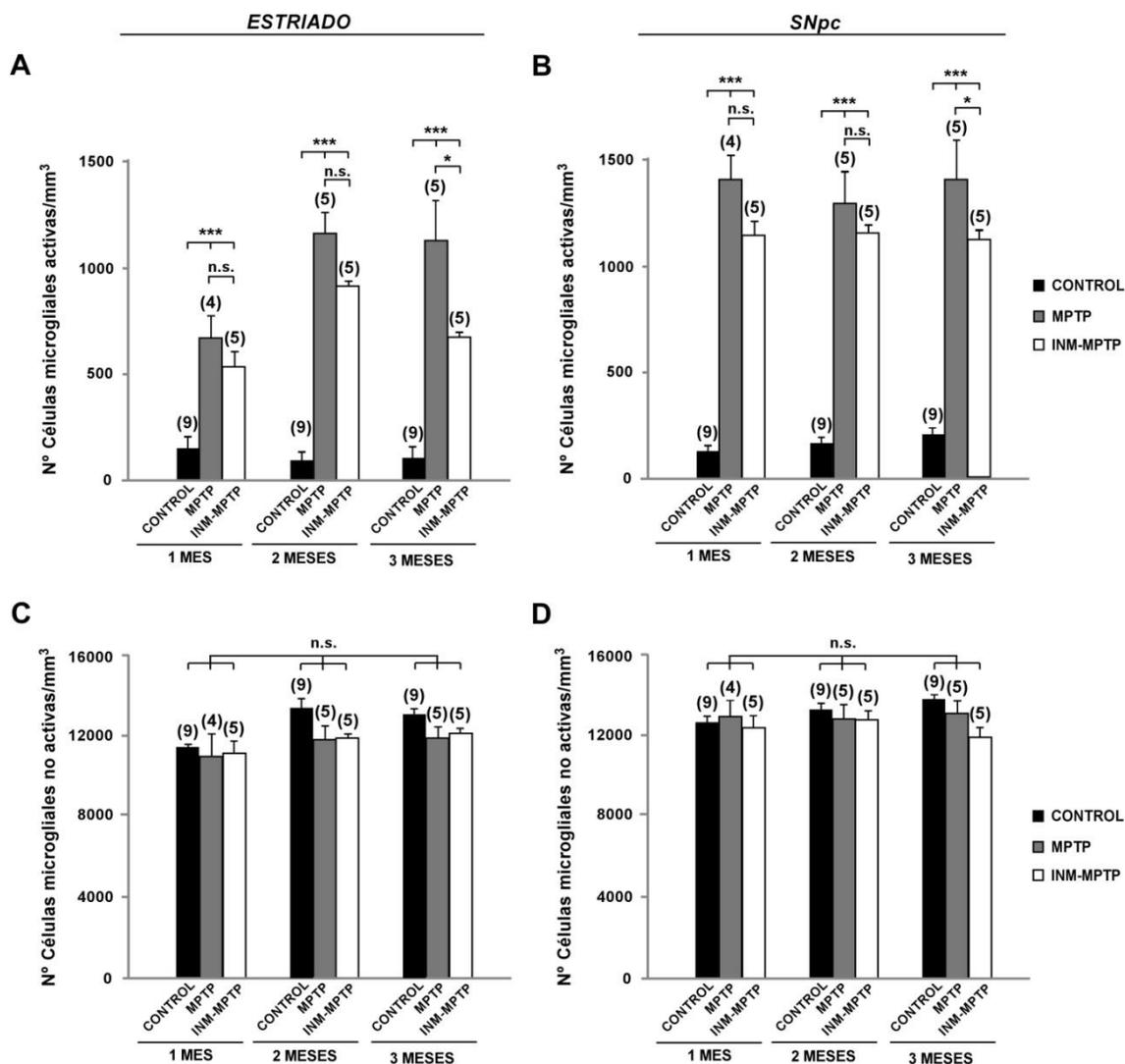
  

<b>SNpc</b>	<b>Densidad microglial (Nº Cels/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>vINM</b>	<b>vMPTP</b>	<b>vINM-vMPTP</b>
<b>1 MES (n = 3)</b>	No Activas ( $p = 0,490$ )	11930,14 ± 645,82	12820,15 ± 248,87	12783,75 ± 137,78
	Activas ( $p = 0,815$ )	105,16 ± 29,71	124,16 ± 23,41	131,02 ± 43,71
<b>2 MESES (n = 3)</b>	No Activas ( $p = 0,411$ )	12833,17 ± 563,26	13666,85 ± 542,60	12961,97 ± 285,99
	Activas ( $p = 0,402$ )	197,50 ± 55,07	98,23 ± 80,30	167,33 ± 26,37
<b>3 MESES (n = 3)</b>	No Activas ( $p = 0,966$ )	13625,48 ± 197,38	13549,70 ± 159,34	13621,18 ± 328,56
	Activas ( $p = 0,421$ )	193,53 ± 51,25	132,42 ± 31,40	167,83 ± 37,24

**Tabla 7. Cuantificación estereológica de la densidad de las células microgliales no activas y activas (nº cels/mm<sup>3</sup>) en el estriado y en la SNpc de los grupos controles vMPTP, vINM y vINM-vMPTP tras 1, 2, ó 3 meses de tratamiento. Se indican los valores de p (ANOVA) y n.**

En el análisis de la densidad de las células microgliales no activas tanto en el estriado como en la SNpc de los animales MPTP y vINM-MPTP, no se observaron diferencias significativas (En estriado:  $p=0,950$  a 1 mes de tratamiento,  $p=0,857$  a 2 meses de tratamiento, y  $p=0,571$  a 3 meses de tratamiento; en SNpc:  $p=0,897$  a 1 mes de tratamiento,  $p=0,565$  a 2 meses de tratamiento, y  $p=0,713$  a 3 meses de tratamiento). De igual modo, tampoco se obtuvieron diferencias significativas respecto a las células microgliales activas de estos grupos animales (En estriado  $p=0,963$  a 1 mes de tratamiento,  $p=0,711$  a 2 meses de tratamiento, y  $p=0,875$  a 3 meses de tratamiento; En SNpc:  $p=0,586$  a 1 mes de tratamiento,  $p=0,878$  a 2 meses de tratamiento, y  $p=0,850$  a 3 meses de tratamiento). Por lo tanto, en las representaciones gráficas se muestran solamente los valores de los grupos MPTP e INM-MPTP respecto a los controles en cada periodo estudiado.

Los resultados reflejan una disminución de la activación microglial en los animales INM-MPTP respecto a los MPTP, tanto en el estriado (~20% tras 1, 2 meses y ~40% a los 3 meses) como en la SNpc (~19, 10 y 22% tras 1, 2 y 3 meses respectivamente). Esta menor activación de la microglía en los animales inmunodeprimidos es estadísticamente significativa en ambas localizaciones sólo a los 3 meses de tratamiento (Figura 29A y B). Respecto a la microglía no activa no se observa ningún efecto significativo por la inmunosupresión (Figura 29C y D).



**Figura 29.** Efecto del tratamiento inmunosupresor en la activación microglial en el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP a 1, 2 ó 3 meses. Densidad de las células microgliales (n° células/mm<sup>3</sup>) activas (A y B) y no activas (C y D) en el estriado (A y C) y en la SNpc (B y D) de los animales CONTROLES, MPTP, e INM-MPTP en cada periodo estudiado (1, 2 ó 3 meses de tratamiento). Entre paréntesis el número de animales de cada grupo, n.s.= no significativo; \*p<0,05; \*\*\*p< 0,001, ANOVA.

### 3. Acción beneficiosa de los xenotrasplantes intraestriatales de CC en ratones parkinsonianos inmunodeprimidos

Una vez establecido el tratamiento inmunosupresor más suave que permite los xenotrasplantes de CC (de rata en ratón) y que es además compatible con el modelo animal de parkinsonismo crónico, se procedió a estudiar la eficacia antiparkinsoniana del CC implantado. Para ello, el mismo día que los ratones fueron trasplantados unilateralmente en estriado con CC de rata y vehículo en el contralateral, comenzó el

tratamiento inmunosupresor (ver punto 2 de Resultados). Al terminar la tercera semana (en la cual se minimiza la administración de fármacos inmunosupresores) se inició la intoxicación con MPTP durante 3 meses. Posteriormente, los ratones fueron mantenidos un mes sólo con la inmunosupresión y, por último, sacrificados 2 días después de la finalización de dicho tratamiento (Figura 30).



**Figura 30.** Esquema del procedimiento experimental utilizado para estudiar el efecto de la inmunosupresión en los xenotrasplantes de CC de rata de ratones parkinsonianos durante algo menos de 5 meses. Se indican los momentos del trasplante y sacrificio, así como los tratamientos inmunosupresor y con MPTP.

### **3.1. Análisis de la evolución general de los animales con xenotrasplantes de CC sometidos a inmunosupresión y parkinsonismo crónico inducido por MPTP**

Durante todo el protocolo experimental antes descrito los animales fueron supervisados diariamente, con control cuantitativo de peso y cualitativo del estado general (aspecto, motilidad e ingesta). Tal y como se indica en la Tabla 8A, de los 11 animales trasplantados y tratados con inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP) sólo tuvo lugar un deceso a lo largo del periodo de tratamiento y ninguno en los 5 controles. Tras el análisis de los pesos de los animales trasplantados INM-MPTP (Tabla 8B), se advirtió una disminución significativa respecto al peso de los controles desde el segundo mes, y especialmente en el tercero. A pesar de estas diferencias, los animales trasplantados INM-MPTP aumentaron de peso a lo largo de los casi 5 meses de tratamiento, y no se detectaron alteraciones cualitativas de aspecto, motilidad o ingesta.

Una vez finalizada la administración de la inmunosupresión y MPTP y el posterior procesado histológico de los cerebros mediante inmunohistoquímica de TH<sup>+</sup>, se observó que el xenotrasplante de CC se encontraba íntegro en los 10 animales estudiados.

Estos resultados indican que el tratamiento inmunosupresor no afecta al estado general del animal, además de permitir la supervivencia a largo plazo de los xenotrasplantes de CC en el modelo crónico de parkinsonismo.

**A**

	<i>Supervivencia animal Vivo/Total</i>	<i>% Supervivencia animal</i>
CONTROL (n=5)	5 / 5	100
INM-MPTP (n=11)	10 / 11	90,9

**B**

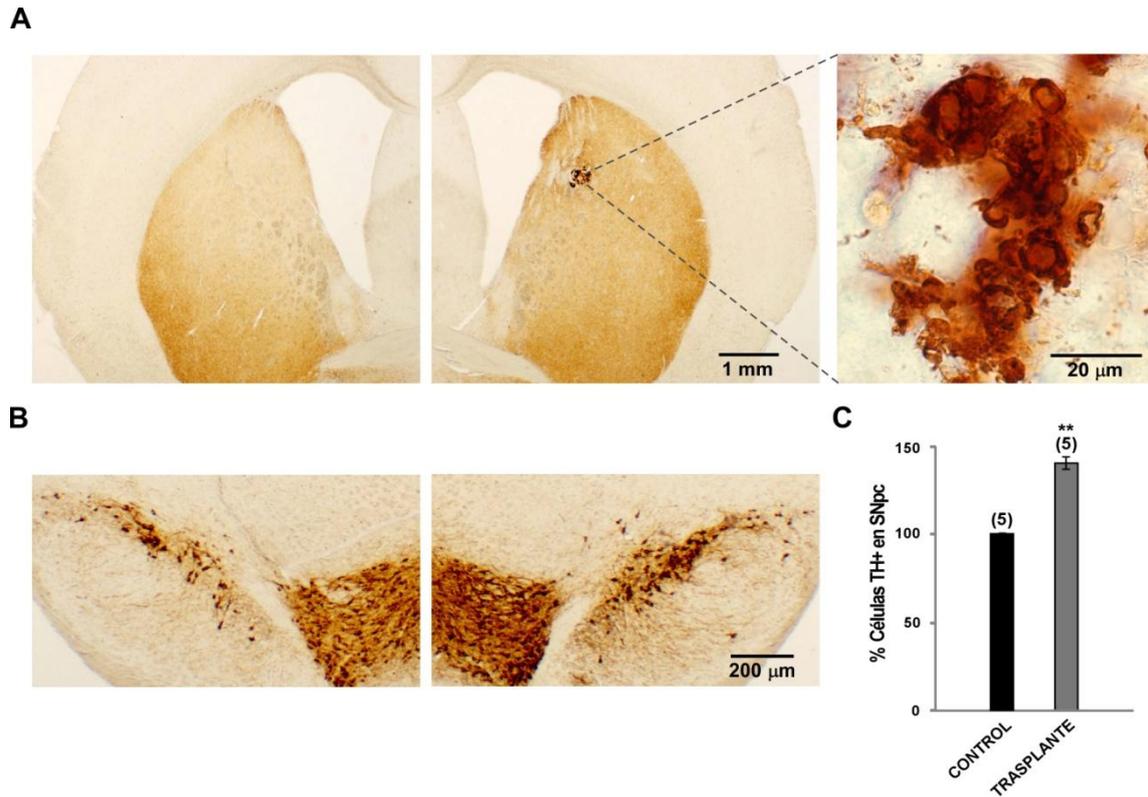
<i>PESO (gramos)</i>	<i>1 MES (p=0,322)</i>	<i>2 MESES (p=0,003)</i>	<i>3 MESES (p&lt;0,001)</i>	<i>4 MESES (p=0,02)</i>	<i>5 MESES (p=0,015)</i>
CONTROL (n=5)	24,81 ± 1,08	26,89 ± 0,45	28,27 ± 0,28	29,15 ± 0,43	31,73 ± 0,44
INM-MPTP (n=10)	23,62 ± 0,33	24,65 ± 0,26**	25,95 ± 0,27***	27,23 ± 0,49*	29,88 ± 0,39*

**Tabla 8. Supervivencia y peso de los ratones trasplantados con CC de rata sometidos a tratamiento inmunosupresor y parkinsonismo crónico.** A. Supervivencia de los ratones xenotrasplantados con CC de rata, tratados con inmunosupresión y parkinsonismo crónico inducido por MPTP (INM-MPTP), y de los controles no trasplantados, tratados con los respectivos vehículos durante el periodo experimental. B. Peso medio mensual (gramos) de los mismos animales que en A. Se indican los valores de p y n. \*p<0,05; \*\*p> 0,01; \*\*\*p<0,001; Test t-Student.

## 3.2. Efecto del xenotrasplante de CC sobre la vía nigroestriatal dopaminérgica

### 3.2.1. Efecto del xenotrasplante de CC sobre las neuronas de la SNpc

El estudio del número de neuronas dopaminérgicas presentes en la vía nigroestriatal de los animales xenotrasplantados, inmunodeprimidos y tratados con MPTP se llevó a cabo mediante la cuantificación estereológica de las neuronas TH<sup>+</sup> de la SNpc. Solo se analizaron aquellos animales en los que el trasplante estaba bien localizado en el estriado (n=5). En la Figura 31 se muestra uno de estos experimentos con un claro aumento de células dopaminérgicas en la SNpc del hemisferio trasplantado, hallándose sobre el 45% más de células que en el hemisferio no trasplantado (145,56 ± 5,19%; Figura 31C), porcentaje similar al observado en los alotrasplantes (Muñoz-Manchado y col., 2013). Además, es importante destacar el buen aspecto del tejido trasplantado (Figura 31A derecha), que no fue rechazado inmunológicamente, lo cual indica la efectividad del tratamiento inmunosupresor.



**Figura 31. Efecto de los xenoinjertos intraestriales de CC sobre la SNpc de los ratones sometidos a tratamiento inmunosupresor y parkinsonismo crónico inducido por MPTP.** A. Inmunohistoquímica para TH en cortes coronales de estriado mostrando la localización del injerto heterólogo de CC, y una zona del mismo a mayor aumento donde se visualizan los glomérulos TH<sup>+</sup> (derecha); y en el hemisferio contralateral el falso injerto, utilizado como control (izquierda). B. Inmunohistoquímica para TH en cortes coronales del mesencéfalo. Nótese el daño causado por el tratamiento crónico de MPTP (izquierda) y la protección ejercida por el xenoinjerto de CC sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (derecha), cuantificada mediante técnicas estereológicas en C. Entre paréntesis el número de animales. \*\*p<0,01; Test t-Student.

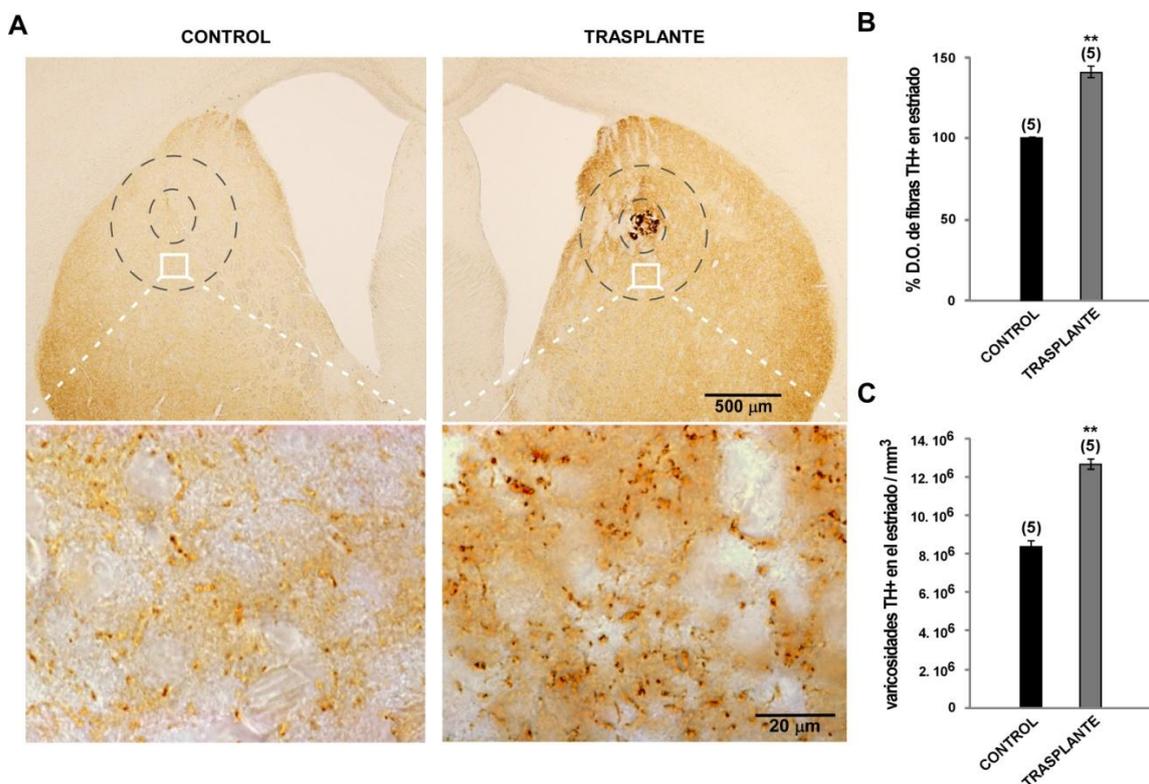
### 3.2.2. Efecto del xenoinjerto de CC sobre la inervación estriatal

Además de sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se estudió el efecto del tratamiento inmunosupresor en la acción que ejerce el injerto carotídeo en la inervación del estriado, zona a la que proyectan dichas neuronas. Para ello se realizó una estimación inicial mediante medidas de densidad óptica en cortes coronales de estriado marcados inmunohistoquímicamente para TH. Al ser trófico el efecto del injerto, se realizó el estudio de la inervación en el área de difusión del factor trófico descartando el propio tejido implantado (véase Materiales y Métodos). Por lo que se trazaron dos circunferencias concéntricas alrededor del injerto y se estimó la inervación estriatal en el área comprendida entre ambas (Figura 32A).

Los datos obtenidos mostraron diferencias significativas entre el lado injertado y el control de los 5 animales estudiados, observándose que el grado de inervación

dopaminérgica era un ~50% mayor en el hemisferio trasplantado respecto al hemisferio control ( $146,44 \pm 7,85\%$ ; Figura 32B), porcentaje similar al observado en los alotrasplantes (Muñoz-Manchado y col., 2013).

Para corroborar de forma más robusta las diferencias observadas mediante densidad óptica en la inervación estriatal entre el hemisferio trasplantado y el control, se realizó una cuantificación estereológica del número de varicosidades TH<sup>+</sup>. Este análisis se llevó a cabo en el mismo área utilizada para el estudio densitométrico, obteniendo un mayor número de varicosidades TH<sup>+</sup> en el hemisferio trasplantado respecto al contralateral también cercano al 50% ( $154,27 \pm 3,83\%$ ; Figura 32D).



**Figura 32. Efecto de los xenoinjertos intraestriatales de CC sobre la inervación estriatal de los ratones sometidos a tratamiento inmunosupresor y parkinsonismo crónico inducido por MPTP.** A. Cortes coronales de estriado teñidos inmunohistoquímicamente para TH, de ratones xenotrasplantados sometidos a tratamiento inmunosupresor y parkinsonismo crónico inducido por MPTP durante ~5 meses. Se muestra el área analizada, comprendida entre las dos circunferencias trazadas alrededor del implante, que se utilizó tanto en el estudio de densitometría de la inervación estriatal dopaminérgica (B) como en el análisis del número de varicosidades TH<sup>+</sup> (C) en el hemisferio trasplantado y el control. En la parte inferior se muestran detalles a mayor amplificación exhibiendo las varicosidades TH<sup>+</sup>. Nótese el aumento del número de varicosidades en el hemisferio trasplantado respecto del control. B. Estimación de la inervación estriatal TH<sup>+</sup> por densidad óptica (D.O.) en el hemisferio trasplantado y el control de los animales descritos en A. C. Cuantificación estereológica del número de varicosidades dopaminérgicas estriatales/mm<sup>3</sup> en el hemisferio trasplantado y el control de los mismos animales utilizados en A y B. Entre paréntesis el número de animales. \*\*p<0,01; Test t-Student.

Los datos expuestos anteriormente tanto en el estudio de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc como de la innervación estriatal, muestran el efecto beneficioso del xenotrasplante de CC sobre la vía nigroestriatal de ratones inmunodeprimidos y con parkinsonismo crónico.

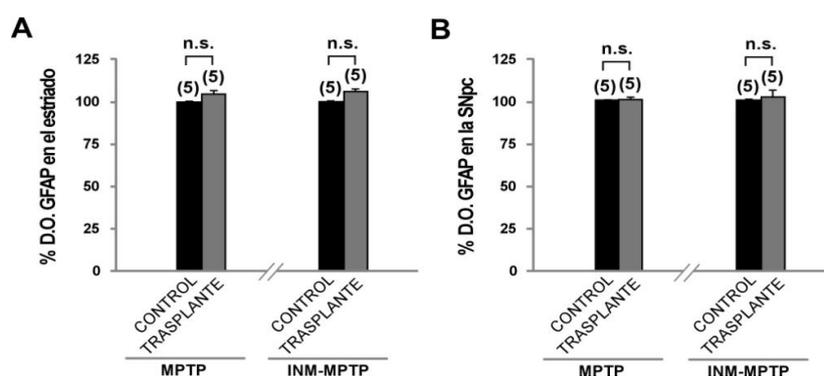
## **4. Efecto del trasplante intraestriatal de CC sobre las poblaciones gliales en estriado y SNpc**

Los resultados descritos con anterioridad en el apartado 2.2 de Resultados sobre los procesos neuroinflamatorios asociados al parkinsonismo crónico por MPTP reflejan la participación de los diferentes tipos gliales. En esta sección se procedió a analizar el efecto que ejercen los trasplantes de CC sobre las poblaciones gliales en el estriado (zona circundante al implante) y en la SNpc, además de examinar el efecto del tratamiento inmunosupresor sobre las mismas. Dicho estudio se llevó a cabo tanto en ratones parkinsonianos trasplantados con CC de ratón (MPTP), como en ratones parkinsonianos e inmunodeprimidos trasplantados con CC de rata (INM-MPTP); siguiendo en ambos casos los mismos procedimientos experimentales antes detallados.

### **4.1. Efecto del trasplante de CC sobre la astrogliía**

Experimentos previos muestran un incremento significativo de la astrogliía tanto en los animales tratados sólo con MPTP como en los sometidos a inmunosupresión y MPTP, sin observarse diferencias entre ambos (ver apartado 2.2.1.1. y 2.2.2.1. de Resultados). La acción del trasplante de CC sobre este tipo glial se analizó mediante la cuantificación del grado de astrogliosis, midiendo la densidad óptica en cortes coronales de estriado y SNpc teñidos inmunohistoquímicamente para GFAP, en los animales trasplantados (n=5 para cada grupo MPTP e INM-MPTP). De nuevo, el estudio densitométrico estriatal se realizó en la zona de difusión de los factores alrededor del implante. Se analizaron 3 cortes por cada animal: el que presentaba mayor tamaño de trasplante y los que se encontraban a  $\pm 180 \mu\text{m}$  de éste en el eje anteroposterior respecto a Bregma. De igual modo se procedió en el hemisferio control. A nivel de la SNpc se cuantificaron también 3 cortes, correspondientes a las secciones anterior y posterior de la que posee la SNpc completamente separada de la VTA por el MT. Para cada animal se calculó el valor medio de las 3 secciones de estriado y de la SNpc.

Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas en la inmunoreactividad de GFAP estriatal entre el hemisferio trasplantado y el contralateral de los animales tratados sólo con MPTP ( $104,69 \pm 1,95\%$ ), y de los sometidos a tratamiento inmunosupresor y MPTP ( $105,37 \pm 1,28\%$ ; Figura 33A). Tampoco se observaron diferencias a nivel de la SNpc (animales MPTP  $100,68 \pm 1,009\%$  y en los INM-MPTP  $102,53 \pm 3,64\%$ ; Figura 33B). Estos resultados reflejan los trasplantes de CC no tienen efecto alguno sobre la población astrogliar de animales con parkinsonismo crónico inducido por MPTP, independientemente de que estén inmunosuprimidos.



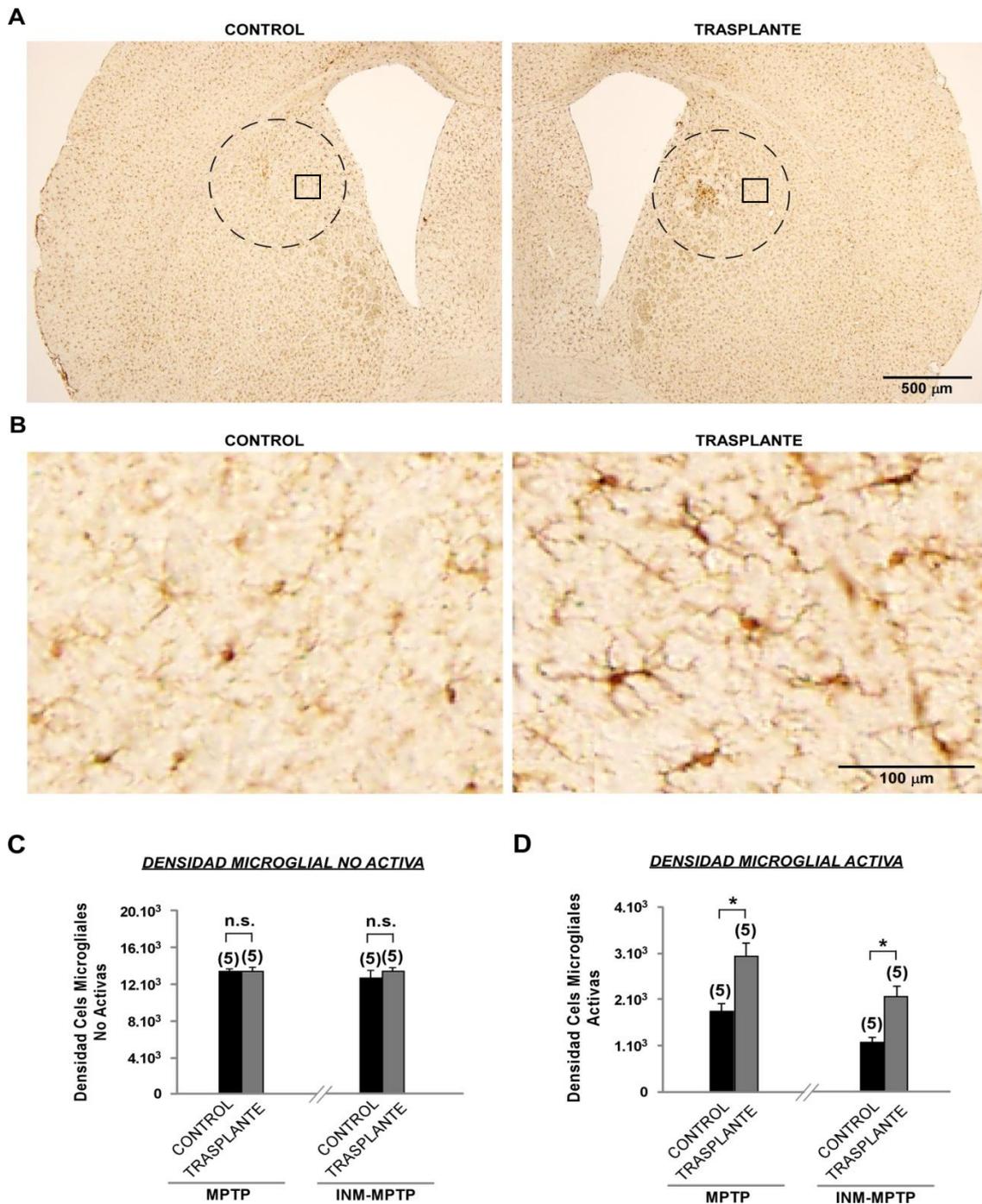
**Figura 33. Efecto de los trasplantes intraestriatales de CC sobre la astrogliía en el modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP, con y sin inmunosupresión.** Cuantificación de la densidad óptica (D.O.) GFAP<sup>+</sup> en el estriado (A) y en la SNpc (B) de los animales trasplantados tratados sólo con MPTP, y los sometidos a inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP) durante ~5 meses. Entre paréntesis el número de animales. n.s. = no significativo; Test t-Student.

## 4.2. Efecto del trasplante de CC sobre la microglía

La reacción microglial es una característica neuropatológica de la EP. Estudios anteriores muestran una clara activación microglial en el modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP, no obstante ésta activación de la microglía se encuentra disminuida en los animales inmunodeprimidos (véase punto 2.2.2.2 de Resultados). Con objeto de profundizar en estos resultados se realizó inmunohistoquímica IBA-1 y se procedió a la cuantificación estereológica de la densidad de las células microgliales no activas y activas, en base al volumen del soma en el estriado y SNpc de los animales trasplantados (n=5 para cada grupo MPTP e INM-MPTP). El análisis en ambas localizaciones se llevó a cabo en la misma zona donde se empleó el estudio densitométrico astrogliar, véase punto 4.1 de Resultados.

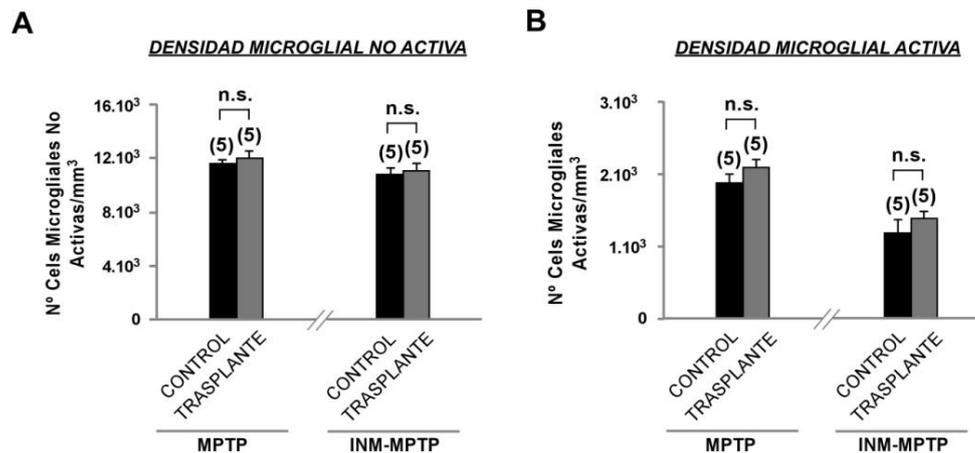
Tal y como se indica en la Figura 34, no existen diferencias en la densidad estriatal de las células microgliales no activas entre el hemisferio trasplantado y el contralateral en los 5 animales estudiados de cada grupo (Figura 34C). Sin embargo, sí aparecen diferencias significativas respecto a la activación microglial, cuantificándose en los animales alotrasplantados MPTP  $2927,08 \pm 299,06$  células microgliales activas/mm<sup>3</sup> en el hemisferio trasplantado y  $1722,11 \pm 211,29$  en el contralateral. Y, en los animales xenotrasplantados INM-MPTP  $2041,46 \pm 251,98$  células microgliales activas/mm<sup>3</sup> en el hemisferio trasplantado frente a las  $1067,02 \pm 111,95$  en el hemisferio contralateral (Figura 34D).

Estos datos sugieren que la activación microglial puede deberse a un efecto paracrino del implante carotídeo sobre las células microgliales aledañas a la zona del trasplante. De esta forma si el efecto de activación microglial observado en el estriado es debido al implante, se esperaría no tener diferencias de activación microglial entre el hemisferio trasplantado y el contralateral en secciones alejadas del trasplante donde el efecto del mismo está muy diluido. Para confirmarlo, se cuantificaron 2 cortes alejados del CC implantado (uno anterior y otro posterior a la zona trasplantada) correspondientes a  $\pm 360 \mu\text{m}$  en el eje anteroposterior respecto al corte de estriado con mayor cantidad de tejido implantado.



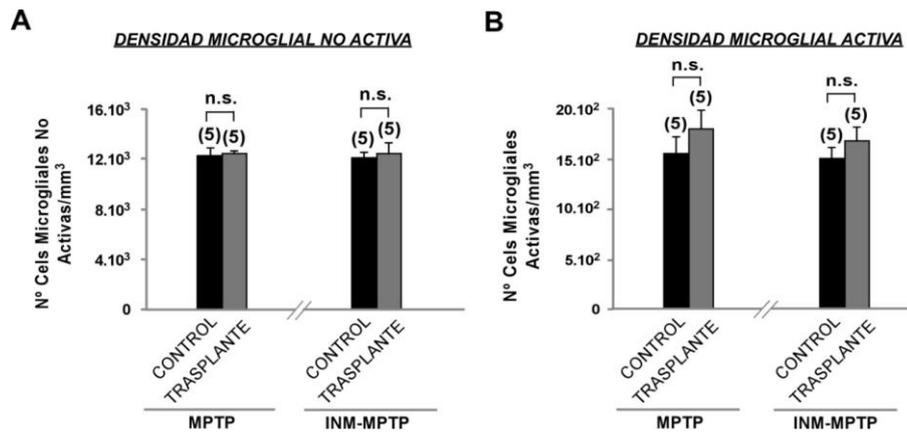
**Figura 34. Efecto de los trasplantes intraestriatales de CC sobre la microglía a nivel del estriado en el modelo crónico de MPTP, con y sin inmunosupresión.** A. Cortes coronales de estriado teñidos inmunohistoquímicamente para IBA-1, de ratones xenotrasplantados sometidos a tratamiento inmunosupresor y parkinsonismo crónico inducido por MPTP durante ~5 meses. Se muestra el área analizada alrededor del implante en el hemisferio trasplantado y el control. B. Se indica a mayor ampliación detalles de la zona estudiada exhibiendo la morfología de las células microgliales. Nótese el incremento de microglía activa en el hemisferio trasplantado respecto del control. C y D. Cuantificación estereológica de la densidad de células microgliales (n° células/mm<sup>3</sup>) no activas (C) y activas (D), en el estriado de los animales trasplantados tratados sólo con MPTP y aquellos sometidos a inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP) durante ~5 meses. Entre paréntesis el número de animales. n.s. = no significativo; \* p<0,05; Test t-Student.

Analizando los resultados, se puede observar cómo no existen diferencias en la densidad de las células microgliales no activas y activas entre el hemisferio trasplantado y el contralateral, tanto en los animales tratados sólo con MPTP como los sometidos a inmunosupresión y MPTP (Figura 35A y B). Por tanto, el incremento de la microglía activa se presenta sólo en la zona circundante al trasplante de CC, lo que pone de manifiesto el efecto paracrino del mismo sobre la población microglial.



**Figura 35. Efecto de los trasplantes intraestriatales de CC sobre la microglía en el modelo crónico de MPTP, con y sin inmunosupresión en secciones coronales alejadas del implante a nivel del estriado.** A y B. Cuantificación estereológica de la densidad de las células microgliales no activas (A), y activas (B) a nivel del estriado en secciones alejadas del implante carotídeo ( $\pm 360 \mu\text{m}$  en el eje anteroposterior respecto al corte de estriado con mayor cantidad de tejido implantado) de animales trasplantados tratados sólo con MPTP, y los sometidos a inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP) durante ~5 meses. Entre paréntesis el número de animales. n.s. = no significativo; Test t-Student.

Tras el claro efecto paracrino del CC observado a nivel de estriado, se cuantificó estereológicamente la densidad de las células microgliales no activas y activas a nivel de la SNpc en la zona lateral al MT. Los datos obtenidos no muestran ninguna diferencia en la densidad microglial entre el hemisferio trasplantado y el contralateral en la SNpc de los animales trasplantados estudiados (Figura 36Ay B). Estos resultados señalan que el proceso de activación microglial tiene lugar sólo en la zona de difusión de los factores alrededor del implante de CC probablemente debido a un efecto paracrino del mismo.



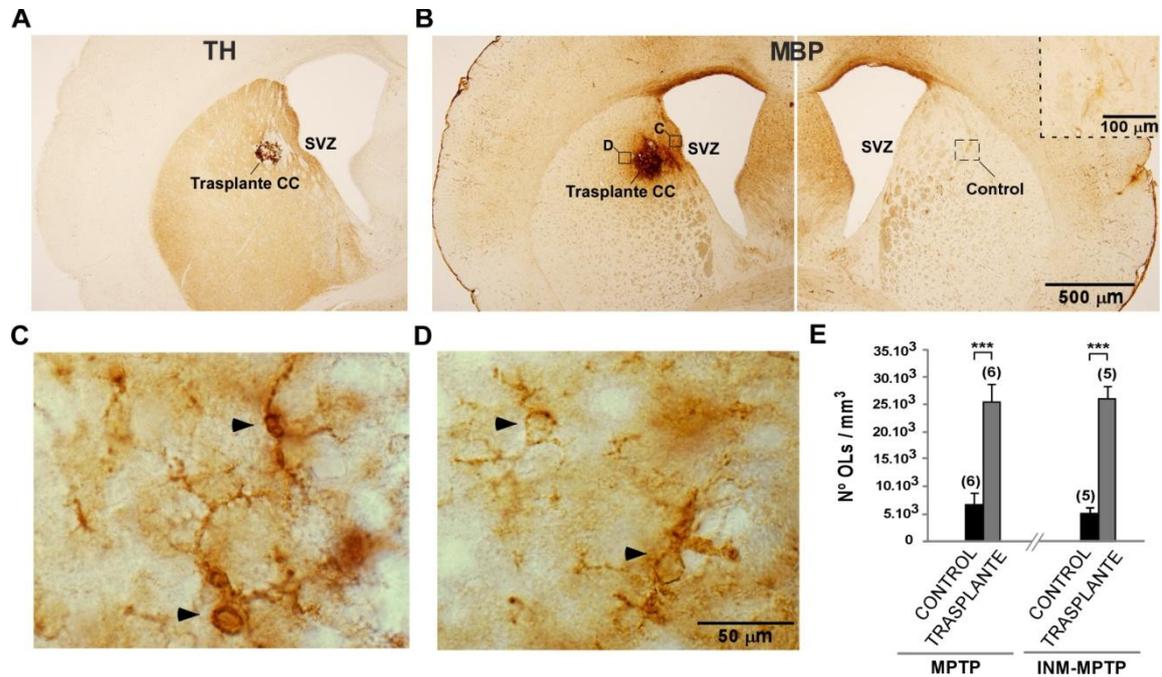
**Figura 36. Efecto de los trasplantes intraestriatales de CC sobre la microglía a nivel de la SNpc en el modelo crónico de MPTP, con y sin inmunosupresión en la SNpc.** A y B. Cuantificación estereológica de la densidad de células microgliales no activas (A) y activas (B) en la SNpc de los animales trasplantados tratados con MPTP, y aquellos sometidos a inmunosupresión y MPTP (INM-MPTP) durante ~5 meses. Entre paréntesis el número de animales. n.s. = no significativo; Test t-Student.

### 4.3. Efecto del trasplante de CC sobre la oligodendroglía

Debido a que han sido descritas evidencias de oligodendrogliosis en ratones y primates sometidos a tratamientos agudos de parkinsonismo con la neurotoxina MPTP (Annese y col., 2013), se procedió a estudiar la acción del trasplante de CC sobre este tipo glial. Para ello se cuantificaron estereológicamente la densidad de oligodendrocitos (n° células/mm<sup>3</sup>) en cortes coronales de estriado teñidos inmunohistoquímicamente para MBP, en los animales trasplantados (n=5 para cada grupo MPTP e INM-MPTP). Este análisis estereológico estriatal se realizó del mismo modo que en el estudio microglial (veáse apartado 4.2 de Resultados).

Como podemos observar en la Figura 37E, los datos resultantes muestran una clara y significativa diferencia en la densidad de oligodendrocitos entre el hemisferio trasplantado y el contralateral tanto en los animales tratados sólo con MPTP (25363,75 ± 3231,22 oligodendrocitos/mm<sup>3</sup> en el hemisferio trasplantado y 6707,61 ± 2007,61 en el contralateral), como en los animales tratados con inmunosupresión y MPTP (25795,84 ± 2288,26 oligodendrocitos /mm<sup>3</sup> en el hemisferio trasplantado y 5165,14 ± 1049,08 en el contralateral). Estas diferencias también pueden apreciarse cualitativamente (Figura 37B). Los resultados muestran un halo de oligodendrocitos circundante al trasplante, no encontrándose presentes en el hemisferio control. Esto indica que el implante de tejido carotídeo ejerce un efecto de reclutamiento sobre la oligodendroglía, la cual puede que migre hacia la región del trasplante desde la zona

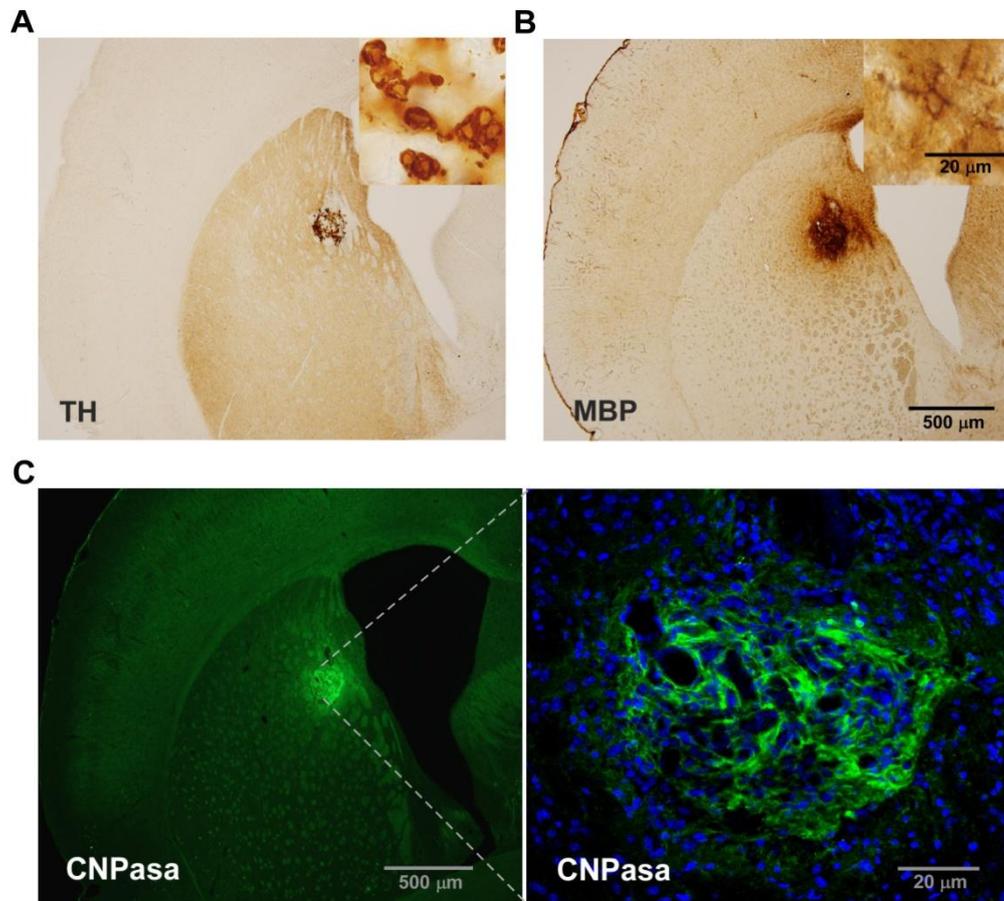
subventricular (SVZ) donde se observa una mayor densidad de oligodendrocitos respecto a otras regiones aledañas al trasplante (Figura 37A y B).



**Figura 37. Efecto de los trasplantes intraestriales de CC sobre la oligodendroglía en el modelo crónico de MPTP, con y sin inmunosupresión.** A Cortes coronales de estriado teñidos mediante inmunohistoquímica para TH de ratones xenotrasplantados con CC sometidos a tratamiento de inmunosupresión y MPTP durante ~5 meses. B. Cortes coronales de estriado consecutivos al mostrado en A teñidos inmunohistoquímicamente para MBP. Se indica el hemisferio trasplantado (izquierda) y el control (derecha), y a mayor aumento el falso trasplante del hemisferio control. C y D. Microfotografías a mayor aumento de dos zonas correspondientes a la zona subventricular (SVZ) y a la opuesta, ambas circundantes al trasplante estriatal señaladas en B. Se visualizan las morfologías e intensidades de tinción de los oligodendrocitos de las localizaciones descritas. E. Cuantificación estereológica de la densidad de la oligodendroglía (N° OLs/mm<sup>3</sup>) en la zona circundante al trasplante intraestriatal de CC en los animales tratados con MPTP, y los sometidos a inmunosupresión y MPTP durante ~5 meses. Entre paréntesis el número de animales. \*\*\*p<0,001; Test t-Student.

Con objeto de confirmar el efecto observado en la inmunohistoquímica para MBP, realizamos una segunda tinción con otro anticuerpo, CNPasa, también marcador de oligodendrocitos. Se realizó inmunofluorescencia CNPasa en secciones coronales de estriado de los mismos animales trasplantados (n=5) correspondientes a la zona trasplantada, y se analizaron cualitativamente mediante microscopía confocal. Como resultado se obtuvo el mismo marcaje fluorescente, respecto al observado con la inmunohistoquímica MBP, y comparando las distintas tinciones (TH, MBP y CNPasa) de la zona trasplantada, se puede apreciar cómo el marcaje de oligodendrocitos se

encuentra presente en la zona de difusión de los factores alrededor del implante (Figura 38).



**Figura 38. Efecto del xenotrasplante intraestriatal de CC sobre la oligodendroglía en el modelo crónico de MPTP tratado con inmunosupresión.** A-C. Microfotografías de cortes coronales de estriado de animales xenotrasplantados con CC y tratados con inmunosupresión y MPTP durante ~5 meses, teñidos inmunohistoquímicamente para TH (A), MBP (B), e inmunofluorescencia CNPasa (C). Se muestran a mayor aumento células TH<sup>+</sup> (A) y la morfología de un oligodendrocito (B) presentes en el implante carotídeo. En C se indica el marcaje fluorescente de CNPasa en verde, y a la derecha se muestra a mayor aumento el trasplante de CC con tinción DAPI de los núcleos celulares (azul).

# DISCUSIÓN

# DISCUSIÓN

El objetivo general de esta tesis doctoral, tal y como se ha comentado con anterioridad, se engloba dentro del principal tema de interés del grupo de investigación, como es la acción neurotrófica ejercida por los trasplantes intraestriatales de CC en modelos experimentales de parkinsonismo, así como su potencialidad terapéutica. Experimentos recientes del grupo muestran que la expresión del factor neurotrófico GDNF por el trasplante intraestriatal de CC se ve afectado por la edad del tejido implantado, lo cual limita la eficacia antiparkinsoniana de los trasplantes de CC procedentes de donantes viejos (véase figura 9 en introducción). Estos resultados aportan una explicación a la relación observada entre la eficacia terapéutica y la edad de los pacientes parkinsonianos autotrasplantados (Arjona y col., 2003). Por tanto, se necesitaba establecer un protocolo de inmunosupresión que permitiera el estudio experimental de las acciones ejercidas por xenotrasplantes de células de cuerpo carotídeo de rata en el modelo crónico, bien establecido en el grupo, de parkinsonismo murino. Además, estos estudios harían posible los xenotrasplantes de tejido humano en el modelo de ratón, como paso previo ineludible a cualquier planteamiento de nuevo ensayo clínico donde probar alotrasplantes de CC humano procedentes de donantes jóvenes en pacientes parkinsonianos poco afectados.

## 1. Inmunosupresión en el SNC

El SNC ha sido considerado un órgano “inmunoprivilegiado” durante décadas debido principalmente al aislamiento producido por la BHE. Clásicamente se ha subestimado el papel del rechazo inmunológico en varios ensayos clínicos en los que se ha analizado el efecto terapéutico de distintos alotrasplantes intracerebrales tanto en EP como en otras enfermedades neurodegenerativas a pesar de la amplia literatura que ha mostrado activación del sistema inmune tras la realización de xenotrasplantes cerebrales en roedores, monos y pacientes (Deacon y col., 1997; Barker y col., 2000; Freed y col., 2001; Larsson y col., 2001; Cicchetti y col., 2003; Olanow y col., 2003; Krystkowiak y col., 2007; Freeman y col., 2011; Badin y col., 2016). En el caso concreto de los trasplantes intraestriatales de células mesencefálicas fetales en pacientes parkinsonianos, en la mayoría de ensayos clínicos abiertos se administró tratamiento inmunosupresor durante al menos un año, mostrándose en estos estudios un importante

beneficio clínico, (Lindvall y col., 1990; Widner y col., 1992; Kefalopoulou y col., 2014). Sin embargo, en los dos ensayos clínicos a doble ciego, donde no se encontró eficacia terapéutica, no se administró inmunosupresión (Freed y col., 2001) o el tratamiento inmunosupresor se retiró a los 6 meses del trasplante (Olanow y col., 2003). En este último caso, se observa además una clara coincidencia temporal entre la reducción de los efectos beneficiosos inducidos por el implante cerebral y el cese de la administración de tratamiento inmunosupresor, sugiriendo un importante papel del rechazo inmunológico en la disminución de los efectos beneficiosos del implante a largo plazo. Los datos obtenidos en nuestro modelo experimental también muestran un importante rechazo inmunológico de los xenotrasplantes de CC en ausencia de inmunosupresión (véase en resultados figuras 16 y 21). En el caso de los xenoinplantos de CC cabe destacar el hecho de que son implantes sólidos, que muestran mayor rechazo inmunológico que las suspensiones celulares debido tanto: a la generación de vasos sanguíneos por el tejido implantado, con la característica alta expresión de proteínas antigénicas del estroma vascular del donante, como a un mayor tiempo de restauración de la BHE (ver Freeman y Brundin., 2006; y Freeman y col., 2011). Por tanto, aunque las características del SNC puedan propiciar una respuesta inmune atenuada ante trasplantes intracerebrales, los datos obtenidos en nuestro modelo experimental de xenotrasplantes, así como los resultados de otros autores en modelos de xeno- y alotrasplantes aconsejan el uso de tratamiento inmunosupresor en los injertos no autólogos (Freeman y col., 2011; Tamburrino y col., 2015; Badin y col., 2016).

Como se ha expuesto anteriormente, en los últimos años se ha alcanzado un cierto consenso en la necesidad de aplicar tratamiento inmunosupresor en xeno y alotrasplantes en el SNC. No obstante, un aspecto importante a tener en cuenta es el tipo de tratamiento inmunosupresor a administrar con el objeto de producir una suficiente protección ante el rechazo del implante cerebral, reduciendo en la medida de lo posible los efectos deletéreos de dicho tratamiento. El procedimiento experimental inmunosupresor más extendido en la literatura para trasplantes intracerebrales no autólogos consiste en la administración de CsA en dosis diarias de 20-30 mg/kg (Freeman y col., 1988; Brundin y col., 1988; Finsen y col., 1988; Pazkaban y col., 1994; Isacson y col., 1995; Honey y col., 1999; Emborg y col., 2008; Yuen y col., 2011; Hovakimyan y col., 2012, Tamburrino y col. 2015). No obstante, la inmunoterapia basada en estas dosis de CsA puede causar importantes efectos secundarios, tal y como

se ha observado en humanos y animales de experimentación. Entre estos efectos destacan la nefrotoxicidad, alteraciones musculares y la afectación del SNC pudiendo dar lugar a temblores y parestesias (Colombo y col., 2011). También se han utilizado terapias inmunosupresoras que combinan CsA y el glucocorticoide Pred, (Pedersen y col., 1995 y 1997; Larsson y col., 2001; Wennberg y col., 2001), lo que permite reducir la dosis y los efectos deletéreos de la CsA. Este corticoesteroide mejora la supervivencia e integridad de los xenotrasplantes debido a que reduce la producción de citoquinas inflamatorias (Kunicka y col., 1993; Duan y col., 1996). Sin embargo, el uso prolongado de Pred también produce efectos adversos, tales como pérdida de peso con disminución del tejido muscular y alteraciones cutáneas.

Los efectos secundarios producidos por las distintas pautas inmunosupresoras descritas en la literatura tienen como consecuencia que sea muy dificultoso el mantenimiento, dentro de unos parámetros aceptables de bienestar animal, de animales de experimentación inmunosuprimidos durante periodos prolongados de tiempo. En la mayoría de los trabajos publicados el tratamiento inmunosupresor se mantuvo tan sólo entre 1-6 semanas tras el xenotrasplante cerebral, sin que se haya analizado experimentalmente los efectos a largo plazo que el tratamiento inmunosupresor pudiera tener tanto en la propia degeneración dopaminérgica nigroestriatal como en los posibles efectos beneficiosos del implante. Por todo ello, un objetivo primordial de esta tesis doctoral fue establecer una pauta inmunosupresora que permitiera estudiar los efectos que pudiera tener la inmunosupresión a largo plazo (3-5 meses) tanto en la degeneración nigroestriatal inducida por MPTP, como en el efecto neuroprotector que el trasplante de CC ejerce en dicha vía. Con este fin se ensayaron 3 protocolos inmunosupresores diferenciándose en la frecuencia de administración de CsA y Pred (15 mg/kg y 20 mg/kg respectivamente), y se analizó el grado de bienestar animal, los efectos sobre el sistema inmune y la supervivencia del xenotrasplante de CC (véase en resultados figuras 17-21). En base a los datos obtenidos, se optó por utilizar el tratamiento inmunosupresor que emplea la menor frecuencia de administración de ambos fármacos (3 veces por semana), ya que produjo la misma supervivencia del xenotrasplante carotídeo que las pautas de inmunosupresión más severas, pero con un menor grado de efectos secundarios. Se comprobó que los animales sometidos al tratamiento inmunosupresor leve a largo plazo tenía una incidencia casi despreciable en el bienestar general del animal (91% de supervivencia y un descenso de sólo ~5% en el peso), y

permitía una completa supervivencia del xenotrasplante de CC de rata, con numerosos glomérulos de células glómicas dopaminérgicas. Además con este protocolo, aunque se consigue una disminución significativa del porcentaje de linfocitos T colaboradores respecto a los animales controles tratados con vehículo, dicha disminución es menos acusada que en los otros dos protocolos de inmunosupresión analizados. Estos datos indican que con el protocolo de inmunosupresión “leve” se obtiene el mismo grado de protección frente al rechazo del xenoimplante cerebral, pero con una reducción del riesgo de infecciones durante el largo periodo experimental, con el agravante del alto grado de manipulación intervencionista inherente al tratamiento s.c. crónico de estos ratones.

## **2. Efecto del tratamiento inmunosupresor en modelos experimentales de parkinsonismo**

### **2.1. Efectos del tratamiento inmunosupresor sobre la degeneración de la vía nigroestriatal dopaminérgica**

Durante las últimas décadas se ha asociado fuertemente la progresión de la enfermedad de Parkinson con posibles alteraciones en la respuesta inmune en general y del proceso neuroinflamatorio en particular, en base a datos epidemiológicos, neurogenéticos, así como estudios experimentales y postmortem (Appel, 2009; Hirsch y Hunot, 2009; Fakhoury, 2016). Esto ha propiciado que se especule con la posibilidad de que distintos tratamientos farmacológicos que modulen la respuesta inmune o neuroinflamatoria puedan enlentecer la progresión de la enfermedad y por lo tanto, afectar al modelo animal de PD. En este sentido, se ha mostrado que el tratamiento inmunosupresor con CsA tiene un efecto protector en modelos de parkinsonismo basados en la inyección de 6-OHDA o administración aguda de MPTP (Matsuura y col., 1996; Borlongan y col., 1996a,b). Además, tanto la manipulación genética como farmacológica de la calcineurina, que es la diana molecular de la CsA, induce la protección de neuronas dopaminérgicas en modelos basados en la agregación de  $\alpha$ -synucleina (Gerard y col., 2010; Caraveo y col., 2014; Luo y col., 2014; Van der Perren y col., 2015). Aunque estos datos sugieren un efecto beneficioso del tratamiento inmunosupresor en modelos experimentales de parkinsonismo, en estos trabajos el periodo de administración de las drogas inmunosupresoras ha sido relativamente corto (entre 1-4 semanas), en relación al curso temporal de nuestros experimentos. En esta tesis doctoral se han analizado los

efectos que tiene un tratamiento inmunosupresor continuado en el modelo murino crónico de EP utilizado, generado por la administración crónica de bajas dosis de la toxina dopaminérgica MPTP (20 mg/kg; 3 veces por semana) durante 3 meses. En este sentido, se ha comprobado que una inmunosupresión leve no ejerce ningún efecto protector sobre la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en el ratón parkinsoniano. Sin embargo, sí produce un aumento significativo en el grado de inervación dopaminérgica estriatal. Estos resultados son similares a los publicados recientemente en un modelo “subcrónico” de parkinsonismo inducido por MPTP (Tamburrino y col., 2015). En dicho modelo se indujo la degeneración dopaminérgica mediante la administración durante 4 semanas de dosis crecientes de MPTP (8, 10, 24 y 32 mg/kg cada semana; 5 veces por semana), y se comprobó el efecto de la administración de CsA (20 mg/Kg; 5 veces por semana) durante todo el periodo experimental. Al igual que en nuestro modelo, se observa que el tratamiento inmunosupresor produce un aumento del grado de inervación estriatal, sin que se produzca una menor degeneración de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. De esta forma, tanto nuestros datos como los publicados en este artículo muestran que aunque la inmunosupresión continuada no mejore la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, si aumenta el grado de inervación dopaminérgica estriatal producido por las neuronas que aún permanecen vivas. En este sentido, datos recientes obtenidos en el grupo de investigación muestran que el tratamiento inmunosupresor continuado induce un aumento significativo en los niveles de dopamina estriatales en animales parkinsonianos.

## **2.2. Efectos del tratamiento inmunosupresor sobre los parámetros neuroinflamatorios asociados al parkinsonismo**

La presencia de astrogliá y microgliá reactiva es una característica neuropatológica de la EP (Damier y col., 1993; McGeer y col., 1998; Hirsch y Hunot, 2009). Distintos trabajos han mostrado reactividad en ambas poblaciones gliales en modelos agudos de EP. No obstante, aunque dicha reactividad astrogliá está bien documentada en la literatura (Alvarez-Fisher y col., 2008; Schintu y col., 2009; Hidalgo-Figueroa y col., 2012), y se observa claramente en nuestro modelo crónico, son varios los autores que no han encontrado una activación microgliá persistente en modelos experimentales subcrónicos de parkinsonismo (Hurley y col., 2003; Furuya y col., 2004; Alvarez-Fisher

y col., 2008). La diversidad de resultados obtenidos en relación a la presencia o ausencia de activación microglial se puede atribuir al uso de distintos marcadores específicos de activación microglial (CD11b, HLA-Dr, iNOs, F4/80...). Debido a la mencionada disparidad de resultados respecto a la reactividad microglial encontrada en la literatura, en esta tesis doctoral se ha desarrollado un sistema estereológico que permite cuantificar la activación microglial. Para ello se marca la microglía con el marcador general IBA-1 y se cuantifica mediante herramientas estereológicas el número de células microgliales en reposo y activas, en base al volumen del soma celular. Mediante esta metodología se pudo comprobar que nuestro modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP produce una significativa activación microglial que además es permanente durante todo el tratamiento neurotóxico.

Además de comprobar la presencia de reactividad astrogliar y microglial en nuestro modelo de parkinsonismo crónico, se analizó el efecto que produce el tratamiento inmunosupresor sobre dichos parámetros neuroinflamatorios. Aunque el tratamiento inmunosupresor no modifica la reacción astrogliar, sí produce un descenso significativo en la densidad de células microgliales activas en la vía nigroestriatal tras el tercer mes de tratamiento de MPTP. Curiosamente este descenso en la densidad de células microgliales activas en la vía nigroestriatal coincide temporalmente con el mayor grado de inervación estriatal observado en los animales parkinsonianos tratados con CsA. Estos datos sugieren que el uso de tratamientos inmunosupresores leves podría ser recomendado no sólo en pacientes parkinsonianos sometidos a trasplantes neurales, sino también como una estrategia terapéutica para reducir el proceso neuroinflamatorio propio de la enfermedad.

### **3. Efecto neuroprotector de los xenotrasplantes de CC sobre la vía nigroestriatal en animales parkinsonianos**

Trabajos previos del grupo de investigación han mostrado que los efectos beneficiosos que ejercen los trasplantes intraestriatales de CC en animales parkinsonianos se deben fundamentalmente a una acción trófica del trasplante sobre la vía dopaminérgica nigroestriatal (Toledo-Aral y col., 2003; Muñoz-Manchado y col., 2013). En esta tesis se estudió si tenían eficacia terapéutica los xenotrasplantes intraestriatales de CC de rata en nuestro modelo en ratón de parkinsonismo crónico inducido por MPTP y con

inmunosupresión leve. Los dos problemas generales teóricos que podrían presentarse serían que la inmunosupresión afectara de alguna manera al efecto trófico y/o que el/los factores tróficos responsables no tuvieran la homología suficiente para generar una acción funcional. Tras el estudio, estas dos posibles limitaciones fueron descartadas, ya que el análisis de la vía nigroestriatal de los animales reveló que el xenotrasplante de CC de rata en ratón parkinsoniano inmunodeprimido ejercía una clara acción neuroprotectora sobre las neuronas TH<sup>+</sup> de la SNpc y la innervación dopaminérgica estriatal (~145% y ~150% respectivamente, en comparación con el lado contralateral con falso trasplante), que era de similar magnitud a la neuroprotección ejercida por los trasplantes de CC procedentes de ratones isogénicos (Muñoz-Manchado y col., 2013). Además, en relación a la posible falta de homología entre los factores tróficos producidos por el xenotrasplante y los propios del tejido receptor, un análisis “in silico” entre el GDNF de rata y ratón muestra que ambos factores presenta un 99,1% de homología ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), sugiriendo una similar actividad neurotrófica en ambos casos. Estos resultados indican claramente que el tratamiento inmunosupresor a largo plazo no altera las propiedades neuroprotectoras que ejerce el trasplante de CC sobre la vía nigroestriatal, sugiriendo que los alotrasplantes de CC en pacientes parkinsonianos, en combinación con un tratamiento inmunosupresor leve, puede ser una opción terapéutica factible.

#### **4. Efectos de los trasplantes intraestriatales de CC sobre las poblaciones gliales**

En trabajos anteriores del grupo se ha mostrado la acción de los trasplantes intraestriatales de CC sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal (Toledo-Aral y col., 2003; Muñoz-Manchado y col., 2013). Sin embargo, no habían sido estudiados hasta el momento los posibles efectos que el trasplante estriatal de CC pudiera tener sobre las distintas poblaciones gliales tanto de estriado como de SNpc. En esta tesis, y debido a la creciente relevancia que está tomando el papel de la neuroinflamación en la fisiopatología de la EP, se ha analizado el efecto que los trasplantes de CC, tanto procedentes de ratones isogénicos como xenotrasplantes de CC de rata en ratones sometidos a inmunosupresión, tienen sobre las distintas poblaciones gliales.

#### **4.1. Efectos sobre la astrogía**

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del tejido cerebral, regulando la neurotransmisión, el equilibrio iónico y de fluidos así como proporcionando factores tróficos y metabolitos para el soporte de la función neuronal. Además, en los últimos años se ha mostrado que los astrocitos también participan en la respuesta neuroinflamatoria. En este sentido, está bien establecido que ante distintas lesiones del SNC se produce una importante reacción astrocitaria (Sofroniew, 2009 y 2010). No obstante, recientemente se han obtenido diversas evidencias de que los astrocitos participan en la determinación del tipo de respuesta neuroinflamatoria que se produce en el tejido cerebral, ya sea una respuesta anti-inflamatoria, y por tanto protectora, o pro-inflamatoria y por tanto deletérea (Colombo y Farina, 2016).

En esta tesis se ha analizado el efecto que tiene el trasplante estriatal de CC sobre los astrocitos de la vía nigroestriatal. Esto se ha realizado tanto en ratones sometidos a trasplantes de CC procedentes de ratones isogénicos, como en ratones sometidos a xenotrasplantes de CC de rata y tratados con inmunosupresión leve. En ambos casos a los ratones se les indujo parkinsonismo mediante el protocolo crónico de parkinson experimental desarrollado en nuestro grupo de investigación (Muñoz-Manchado y col., 2013, 2016). En ambas condiciones experimentales se comprobó que el implante de CC no modificaba las reacción astrogial de los ratones trasplantados y sometidos a parkinsonismo ni en el estriado ni en la SNpc, mostrándose que dicho implante no produce ningún efecto sobre los astrocitos de la vía nigroestriatal.

#### **4.2. Efectos sobre la microglía**

Las células microgliales son las principales células residentes del sistema inmune en el SNC, desempeñando un papel fundamental en la respuesta neuroinflamatoria asociada a la neurodegeneración (Wong y col., 2013). En esta tesis doctoral se ha mostrado que en nuestro modelo crónico de parkinsonismo inducido por MPTP se produce una importante activación microglial, así como que la administración crónica del tratamiento inmunosupresor leve reduce esta activación en el estriado de los ratones parkinsonianos. Por tanto, se consideró que un aspecto importante a estudiar sería el efecto que pudiera ejercer el implante de CC sobre la población microglial de la vía nigroestriatal. Esto se hizo, al igual que para el análisis de la activación astrogial, tanto

en ratones sometidos a trasplantes de CC isogénicos, como en aquellos con xenotrasplantes de CC de rata y con inmunosupresión leve, que posteriormente fueron tratados crónicamente con la neurotoxina MPTP. El análisis de estos animales reveló que el trasplante de CC no producía ninguna modificación en la densidad de células microgliales no activas, ni en el parénquima circundante al implante, ni en la SNpc. Sin embargo, se observó un claro aumento de la densidad de células microgliales activas en las zonas aledañas al trasplante de CC, mientras que no había tampoco modificación en la densidad de células microgliales activas a nivel de la SNpc. Si dicha activación microglial se debe a un factor soluble liberado por el trasplante de CC, esta activación se debe reducir en regiones estriatales que estén alejadas del implante. Esta hipótesis se comprobó en rodajas estriatales que estaban alejadas del trasplante de CC más de 360  $\mu\text{m}$  (en base a la distancia de difusión del GDNF, Piltonen y col., 2009) en el eje anteroposterior, observándose que en dichas rodajas no se producía un aumento significativo de la densidad de microglía activa en comparación con el estriado contralateral. Por tanto, estos experimentos sugieren que el trasplante estriatal de CC produce una activación paracrina de las células microgliales en las regiones estriatales aledañas.

La activación microglial, de forma similar a la que ocurre con los macrófagos periféricos, se ha descrito que puede comprender, al menos, dos estados funcionales diferenciados. El primero es el conocido como “activación clásica” o “M1”, la cual se caracteriza por la producción citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6). Este estado se relaciona con la respuesta inicial al daño, y una cronificación del mismo se relaciona con un incremento del proceso neurodegenerativo. El segundo estado de activación es el que se conoce como “activación alternativa” o “M2”, y se relaciona con una acción anti-inflamatoria mediada por la secreción de citoquinas IL-10 e IL-4, que produciría una acción protectora en el tejido dañado (Schober y col., 2004; McGeer y McGeer, 2008; Herrera y col., 2015). En esta tesis no se ha analizado si el aumento en el número de microglía activa que induce el trasplante intraestriatal corresponde preferentemente a células microgliales con fenotipo “M1”, pro-inflamatorio, o “M2”, anti-inflamatorio, siendo un tema en el cual el laboratorio está iniciando experimentos para determinar el “perfil inflamatorio” de la microglia estriatal activada por los trasplantes de CC, así como el posible factor soluble liberado por el CC que produzca dicha acción. En este sentido, existen controversias en la literatura sobre el papel que

desarrolla el GDNF, que en nuestro caso es liberado activamente por el trasplante de CC, en relación a la activación microglial. Unos autores proponen al GDNF como un inhibidor de la activación microglial (Rocha y col., 2012), y otros muestran que el GDNF no bloquea dicha activación de la microglía (Zlotnick y Spittau, 2014). Por otro lado, el BDNF, otro factor neurotrófico que también es expresado en el CC, se ha sugerido como un modulador de la respuesta inflamatoria mediada por la microglía (Mizoguchi y col., 2009). Por tanto, un aspecto que habrá que aclarar experimentalmente en el futuro es el efecto que tiene el trasplante de CC sobre la microglía estriatal, y las posibles limitaciones o beneficios que este efecto pueda tener en el uso terapéutico de dichos trasplantes.

### **4.3. Efectos sobre la oligodendroglía**

Un aspecto de los trasplantes estriatales de CC que era desconocido y que resulta especialmente llamativo, es su gran poder de reclutamiento de oligodendrocitos. En esta tesis se ha mostrado que los trasplantes carotídeos inducen un claro aumento en el número de oligodendrocitos en las zonas proximales al implante, en comparación con las mismas zonas del hemisferio contralateral con falso trasplante. Aunque en esta tesis no se ha podido determinar con exactitud la procedencia de dichas células gliales, el análisis cualitativo de las imágenes sugiere que los oligodendrocitos reclutados por el implante pudieran proceder de precursores del nicho neurogénico del área subventricular (Buffo y col., 2005; Menn y col., 2006; Jablonska y col., 2010), o de precursores oligodendrogiales, NG2<sup>+</sup>, presentes en el cuerpo caloso (Trotter y col., 2010). En este sentido, resulta interesante que el EGF (del inglés "Epidermal Growth factor") que se expresa en el CC (Porzionato y col., 2008), se haya descrito como un potente activador de la oligodendrogénesis procedente de la zona subventricular (Aguirre y col., 2010; Gonzalez-Perez y Álvarez-Buylla, 2011). Este efecto de reclutamiento de oligodendrocitos inducido por el trasplante de CC, así como el posible efecto activador sobre la zona subventricular, es un tema que el laboratorio está estudiando actualmente.

## 5. Perspectivas futuras

Esta tesis doctoral ha mostrado la necesidad de aplicar tratamiento inmunosupresor para obtener una supervivencia aceptable cuando se realizan trasplantes neurales que no sean isogénicos. Estos resultados están en plena concordancia con distintos trabajos publicados recientemente (Badin y col., 2016; Tamburrino y col., 2015; Mathieux y col., 2014) y que han servido, para aclarar la polémica surgida sobre el uso de inmunosupresión en el campo de la terapia celular antiparkinsoniana a raíz de los ensayos clínicos con células mesencefálicas fetales (Freed y col., 2001; Olanow y col., 2003; Krystkowiak y col., 2007; Freeman y col., 2011). Otro aspecto de la tesis doctoral que consideramos de especial relevancia es el haber establecido un protocolo de inmunosupresión que permite mantener los ratones inmunosuprimidos por un periodo prolongado de tiempo en buenas condiciones de bienestar animal, y por lo tanto es compatible con nuestro modelo crónico de parkinsonismo. Además, se ha mostrado que el tratamiento inmunosupresor prolongado, además de reducir la neuroinflamación en la vía nigroestriatal y mejorar la inervación dopaminérgica, no altera la actividad neurotrófica de los xenotrasplantes de CC. Por lo tanto, este protocolo de inmunosupresión será fundamental para que el laboratorio pueda ensayar la actividad neuroprotectora de xenotrasplantes de CC humano, y estudiar el efecto de la edad en su efecto beneficioso antiparkinsoniano. Asimismo, este modelo permitirá analizar las posibilidades terapéuticas del CC expandido “in vitro” mediante la realización de xenotrasplantes de neuroesferas de CC procedentes de rata en ratones parkinsonianos. Por otro lado, los resultados obtenidos acerca del efecto del trasplante de CC en las poblaciones gliales del estriado han abierto nuevas líneas de investigación que el grupo está abordando en la actualidad.

En definitiva, creemos que los resultados obtenidos en esta tesis, junto con los datos obtenidos en proyectos paralelos acerca de la regulación de GDNF y efectividad terapéutica del CC humano, van a permitir la realización de experimentos que supongan la base preclínica de un nuevo ensayo en humanos en el que se realicen alotrasplantes de CC de donantes jóvenes en pacientes parkinsonianos poco afectados.

## **CONCLUSIONES**

# CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta tesis doctoral son:

1. Es necesario un tratamiento inmunosupresor continuado para garantizar la supervivencia de los xenotrasplantes de CC en el parénquima cerebral.
2. Entre los distintos tratamientos inmunosupresores estudiados (severo, intermedio y leve) el tratamiento leve es el más adecuado para estudiar el efecto de xenotrasplantes de CC en modelos de parkinsonismo crónico, debido a que dicho tratamiento leve asegura la supervivencia del tejido implantado minimizando los efectos secundarios en el animal receptor.
3. El tratamiento inmunosupresor prolongado protege la degeneración de terminales dopaminérgicos estriatales sin modificar la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en un modelo de parkinsonismo crónico inducido por MPTP.
4. El tratamiento inmunosupresor continuado reduce la activación microglial asociada al parkinsonismo crónico inducido por MPTP. No obstante, dicho tratamiento inmunosupresor no modifica la astrogliosis en este modelo experimental.
5. Los xenotrasplantes de CC de rata ejercen un efecto trófico sobre la vía nigroestriatal similar al producido por trasplantes isogénicos. El tratamiento inmunosupresor crónico no modifica la acción neurotrófica ejercida por los trasplantes de CC sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.
6. Los trasplantes intraestriatales de CC no modifican la astrogliosis asociada al parkinsonismo experimental crónico inducido por MPTP.

7. El implante estriatal de CC produce activación de las células microgliales estriatales, posiblemente mediante un efecto paracrino. Dicha activación microglial no se ve modificada por el tratamiento inmunosupresor crónico.
  
8. El trasplante estriatal de CC produce un importante efecto de células oligodendrogliales en la zona estriatal aledaña al implante. Este proceso de reclutamiento no se altera por el tratamiento inmunosupresor continuado.

## **ANEXO I: ABREVIATURAS**

## ANEXO I: ABREVIATURAS

<b>6-OHDA</b>	116-hidroxidopamina
<b>ACE</b>	Arteria Carótida Externa
<b>ACI</b>	Arteria Carótida Interna
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>CaN</b>	Calcineurina
<b>CC</b>	Cuerpo Carotídeo
<b>CD3<sup>+</sup></b>	Linfocitos T Totales
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Linfocitos T Helper o cooperadores
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>CNPasa</b>	2', 3'-nucleotido cíclico 3'fosfodiesterasa
<b>COMT</b>	Catecol-O-Metiltransferasa
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CyP</b>	Ciclofilina
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAT</b>	Transportador de Dopamina
<b>DOPA</b>	3,4-dihidroxifenilalanina
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>GDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado de Glía
<b>GFAP</b>	Proteína Gliofibrilar Ácida
<b>IBA-1</b>	Anticuerpo del calcio ionizado de unión a la molécula 1
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>MAO-B</b>	Monoamino Oxidasa B
<b>MBP</b>	Proteína de la Mielina
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>MT</b>	Núcleo Terminal Medial
<b>NFATc</b>	Factor nuclear de las Células T Activadas
<b>OLs</b>	Oligodendrocitos

<b>Pred</b> .....	Prednisolona
<b>ROS</b> .....	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>SAL</b> .....	Salino
<b>s.c.</b> .....	Subcutánea
<b>SNC</b> .....	Sistema Nervioso Central
<b>SNpc</b> .....	Sustancia Negra <i>pars compacta</i>
<b>SVZ</b> .....	Zona Subventricular
<b>TH</b> .....	Tirosina Hidroxilasa
<b>Tto</b> .....	Tratamiento
<b>VEH</b> .....	Vehículo
<b>VMAT</b> .....	Transportador Vesicular de Monoaminas
<b>VTA</b> .....	Área Tegmental Ventral

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

Adams, J.D. Jr., Klaidman, L.K., Leung, A.C., 1993, MPP<sup>+</sup> and MPDP<sup>+</sup> induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med*, 15(2):181-6.

Aguirre, A., Rubio, M.E., Gallo, V., 2010, Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*, 467(7313):323-7.

Akerud, P., Canals, J.M., Snyder, E.Y., Arenas, E., 2001, Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 21(20):8108-18.

Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E.C., Hartmann, A., Michel, P.P., 2008, Modelling Parkinson-likeneurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J Neurochem*, 107(3):701-11.

Annese, V., Barcia, C., Ros-Bernal, F., Gómez, A., Ros, C.M., De Pablos, V., Fernández-Villalba, E., De Stefano, M.E., Herrero, M.T., 2013, Evidence of oligodendrogliosis in 1 methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinsonism. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39(2):132-43.

Appel, S.H., 2009, CD4<sup>+</sup> T cells mediate cytotoxicity in neurodegenerative diseases. *J Clin Invest*, 119(1):13-5.

Arenas, E., 2010, Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(1):152-6.

Arjona, V., Minguez-Castellanos, A., Montoro, R. J., Ortega, A., Escamilla, F., Toledo-Aral, J. J., Pardal, R., Mendez-Ferrer, S., Martin, J. M., Perez, M., Katati, M. J., Valencia, E., Garcia, T., Lopez-Barneo, J., 2003, Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery*, 53(2):321-8; discussion 328-30.

Armstrong, R.J., Harrower, T.P., Hurelbrink, C.B., McLaughlin, M., Ratcliffe, E.L., Tyers, P., Richards, A., Dunnett, S.B., Rosser, A.E., Barker, R.A., 2001, Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience*, 106(1):201- 16.

Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A., Karin, M., 1995, Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270(5234):286-90.

Badin, R., Vadori, M., Vanhove, B., Nerriere-Daguin, V., Naveilhan, P., Neveu, I., Jan, C., Lévèque, X., Venturi, E., Mermillod, P., Van Camp, N., Dollé, F., Guillermier, M., Denaro, L., Manara, R., Citton, V., Simioni, P., Zampieri, P., D'avella, D., Rubello, D., Fante, F., Boldrin, M., De Benedictis, G.M., Cavicchioli, L., Sgarabotto, D., Plebani, M., Stefani, A.L., Brachet, P., Blancho, G., Soullillou, J.P., Hantraye, P., Cozzi, E., 2016, Cell Therapy for Parkinson's Disease: A Translational Approach to Assess the Role of Local and Systemic Immunosuppression. *Am J Transplant*, 16:2016–2029.

Barcia, C., Sánchez Bahillo, A., Fernández-Villalba, E., Bautista, V., Poza y Poza, M., Fernández-Barreiro, A., Hirsch, E.C., Herrero, M.T., 2004. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia*. 46(4):402-9.

Barcia, C., 2013. Glial-mediated inflammation underlying parkinsonism. *Scientifica* (Cairo), Jul 11: 357805.

Bauer, S., Kerr, B.J., Patterson, P.H., 2007, The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci*, 8:221-232.

Barker, C.F., Billingham, R.E., 1977, Immunologically privileged sites. *Adv Immunol*, 25:1-54.

Barker, R.A., Kendall, A.L., Widner, H., 2000, Neural tissue xenotransplantation: what is needed prior to clinical trials in Parkinson's disease? Neural Tissue Xenografting Project. *Cell Transplant*, Mar-Apr 9(2):235-46.

Benveniste, E.N., Kwon, J., Chung, W.J., Sampson, J., Pandya, K., Tang, L.P., 1994, Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF-beta. *J Immunol*, 153(11):5210-21.

Biernacki, K., Prat, A., Blain, M., Antel, J.P., 2001, Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(12):1127-36.

Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., Gage, F.H., 1982, Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature*, 298(5875):652-4.

Björklund, A., Rosenblad, C., Winkler, C., Kirik, D., 1997, Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 4(3-4):186-200.

Björklund, A., Dunnett, S.B., Brundin, P., Stoessl, A.J., Freed, C.R., Breeze, R.E., Levivier, M., Peschanski, M., Studer, L., Barker, R., 2003, Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2:437-445.

- Bjorklund, T., Kordower, J.H., 2010, Gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 25 Suppl 1:S161-73.
- Bjorklund, A., Kordower, J.H., 2013, Cell therapy for Parkinson's disease: what next?. *Mov Disord*, Jan 28(1):110-5.
- Blandini, F., Armentero, M.T., 2012, Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279(7):1156-66.
- Blomstedt, P., Hariz, M. I., 2006, Are complications less common in deep brain stimulation than in ablative procedures for movement disorders? *Stereotact Funct Neurosurg*, 84(2-3):72-81.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., Verna, J. M., 2001, Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65(2):135-72.
- Borel, J.F., Feurer, C., Magnée, C., Stähelin, H., 1977, Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*, 32(6):1017-25.
- Borlongan, C.V., Freeman, T.B., Hauser, R.A., Cahill, D.W., Sanberg, P.R., 1996a, Cyclosporine-A increases locomotor activity in rats with 6-hydroxydopamine- induced hemiparkinsonism: relevance to neural transplantation. *Surg Neurol*, 46(4):384-8.
- Borlongan, C.V., Stahl, C.E., Cameron, D.F., Saporta, S., Freeman, T.B., Cahill, D.W., Sanberg, P.R., 1996b, CNS immunological modulation of neural graft rejection and survival. *Neurol Res*, 18(4):297-304.
- Borlongan, C.V., Kwanbara, Y., Fujisaki, T., Watanabe, S., 1999, Cyclosporine-A reduces spontaneous place preference in adult rats. *Neurosci Lett*, 267(3):169-72.
- Borlongan, C.V., Stahl, C.E., Fujisaki, T., Sanberg, P.R., Watanabe, S., 1999, Cyclosporine A-induced hyperactivity in rats: is it mediated by immunosuppression, neurotrophism, or both?. *Cell Transplant*, 8(1):153-9.
- Borlongan, C.V., Sanberg, P.R., Freeman, T.B., 1999, Neural transplantation for neurodegenerative disorders. *Lancet*, 353 Suppl 1:SI29-30.
- Bové, J., Perier, C., 2012, Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211:51-76.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Braak, E., 2003, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24(2):197-211.

Braak, H., Sastre, M., Del Tredici, K., 2007, Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 114(3):231-41.

Braak, H., Del Tredici, K., 2008, Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 70(20):1916-25.

Breidert, T., Callebert, J., Heneka, M.T., Landreth, G., Launay, J.M., Hirsch, E.C., 2002, Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 82(3):615-24.

Brevig, T., Holgersson, J., Widner, H., 2000, Xenotransplantation for CNS repair: immunological barriers and strategies to overcome them. *Trends Neurosci*, 23(8):337-44.

Brundin, P., Nilsson, O.G., Gage, F.H., Björklund, A., 1985, Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp Brain Res*, 60(1):204-8.

Brundin, P., Barbin, G., Strecker, R.E., Isacson, O., Prochiantz, A., Björklund, A., 1988, Survival and function of dissociated rat dopamine neurones grafted at different developmental stages or after being cultured in vitro. *Brain Res*, 467(2):233-43.

Brundin, P., Strecker, R.E., Widner, H., Clarke, D.J, Nilsson, O.G., Astedt, B., Lindvall, O., Björklund, A., 1988, Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res*, 70(1):192-208.

Buffo, A., Vosko, M.R., Ertürk, D., Hamann, G.F., Jucker, M., Rowitch, D., Götz, M., 2005, Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50):18183-8.

Caraveo, G., Auluck, P.K., Whitesell, L., Chung, C.Y., Baru, V., Mosharov, E.V., Yan, X., Ben-Johny, M., Soste, M., Picotti, P., Kim, H., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Sulzer, D., Yue, D.T., Lindquist, S., 2014, Calcineurin determines toxic versus beneficial responses to  $\alpha$ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug 26; 111(34):E3544-52.

Cavalieri, B., 1966, Geometria degli indivisibili, Unione Tipografico, Torino.

Chiba, K., Trevor, A., Castagnoli, N., Jr., 1984, Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 120(2):574-8.

Cicchetti, F., Fodor, W., Deacon, T.W., van Horne, C., Rollins, S., Burton, W., Costantini, L.C., Isacson, O., 2003, Immune parameters relevant to neural xenograft survival in the primate brain. *Xenotransplantation*, 10(1):41-9.

Chitilian, H.V., Laufer, T.M., Stenger, K., Shea, S., Auchincloss, H.Jr., 1998, The strength of cell-mediated xenograft rejection in the mouse is due to the CD4<sup>+</sup> indirect response. *Xenotransplantation*, 5(1):93-8.

Chu, G., Markmann, J.F., Ahn, M., Chang, E., DeMatteo, R.P., Ketchum, R.J., Brayman, K.I., Deng, S., Barker, C.F., 1997, Xenogeneic but not allogeneic pancreatic islet graft survival in recipients lacking humoral immunity and major histocompatibility complex class II antigens. *Transplant Proc*, 29(1-2):901-2.

Collier, T.J., Kanaan, N.M., Kordower, J.H., 2011, Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci*, 12(6):359-66.

Colombo, D., Ammirati, E., 2011, Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. *J Biol Regul Homeost Agents*, 25(4):493-504.

Colombo, E., Farina, C., 2016, Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*, 37(9):608-20.

Cronstein, B.N., Kimmel, S.C., Levin, R.I., Martiniuk, F., Weissmann, G., 1992, A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(21):9991-5.

Cullheim, S., Thams, S., 2007, The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Res Rev*, Aug 55(1):89-96.

Czyzyk-Krzeska, M.F., Bayliss, D.A., Lawson, E.E., Millhorn, D.E., 1992, Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem*, 58(4):1538-46.

Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., Javoy-Agid, F., 1993, Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience*, 52(1):1-6.

Darvesh, S., Leblanc, A.M., Macdonald, I.R., Reid, G.A., Bhan, V., Macaulay, R.J., Fisk, J.D., 2010, Butyrylcholinesterase activity in multiple sclerosis neuropathology. *Chem Biol Interact*, 187(1-3):425-31.

Date, I., Kawamura, K., Nakashima, H., 1988, Histological signs of immune reactions against allogeneic solid fetal neural grafts in the mouse cerebellum depend on the MHC locus. *Exp Brain Res*, 73(1):15-22.

Dauer, W., Przedborski, S., 2003, Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39:196-221.

Davie, C., 2008, A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin*, 86: 109-127.

Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2003, Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, 302 (5646):819-22.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney, D., Kassissieh, S., Dempsey, P., Isacson, O., 1997, Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med*, 3(3):350-3.

Del Rio-Hortega, P., 1932, Microglia In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, edited by Penfield W. *New York: Hoeber*, p. 482–1924–534.

Del Zompo, M., Piccardi, M.P., Ruiu, S., Quartu, M., Gessa, G.L., Vaccari, A., 1993, Selective MPP<sup>+</sup> uptake into synaptic dopamine vesicles: possible involvement in MPTP neurotoxicity. *Br J Pharmacol*, 109(2):411-4.

Diedrich, J., Wietgreffe, S., Zupancic, M., Staskus, K., Retzel, E., Haase, A.T., Race, R., 1987, The molecular pathogenesis of astrogliosis in scrapie and Alzheimer's disease. *Microb Pathog*, 2(6):435-42.

Duan, W.M., Widner, H., Björklund, A., Brundin, P., 1993, Sequential intrastriatal grafting of allogeneic embryonic dopamine-rich neuronal tissue in adult rats: will the second graft be rejected?. *Neuroscience*, 57(2):261-74.

Duan, W.M., Widner, H., Frodl, E.M., Brundin, P., 1995, Immune reactions following systemic immunization prior or subsequent to intrastriatal transplantation of allogeneic mesencephalic tissue in adult rats. *Neuroscience*, 64(3):629-41.

Duan, W.M., Widner, H., Brundin, P., 1995, Temporal pattern of host responses against intrastriatal grafts of syngeneic, allogeneic or xenogeneic embryonic neuronal tissue in rats. *Exp Brain Res*, 104(2):227-42.

Duan, W.M., Brundin, P., Grasbon-Frodl, E.M., Widner, H., 1996, Methylprednisolone prevents rejection of intrastriatal grafts of xenogeneic embryonic neural tissue in adult rats. *Brain Res*, 712(2):199-212.

Duan, W.M., Westerman, M., Flores, T., Low, W.C., 2001, Survival of intrastriatal xenografts of ventral mesencephalic dopamine neurons from MHC-deficient mice to adult rats. *Exp Neurol*, 167(1):108-17.

Duan, W.M., Westerman, M.A., Wong, G., Low, W.C., 2002, Rat nigral xenografts survive in the brain of MHC class II-, but not class I-deficient mice. *Neuroscience*, 115(2):495-504.

Dunnett, S. B., Bjorklund, A., Lindvall, O., 2001, Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci*, 2(5):365-9.

Dunnett, S.B., Rosser, A.E., 2011, Clinical translation of cell transplantation in the brain. *Curr Opin Organ Transplant*, 16(6):632-9.

Emborg, M.E., Ebert, A.D., Moirano, J., Peng, S., Suzuki, M., Capowski, E., Joers, V., Roitberg, B.Z., Aebischer, P., Svendsen, C.N., 2008, GDNF-secreting human neural progenitor cells increase tyrosine hydroxylase and VMAT2 expression in MPTP-treated cynomolgus monkeys. *Cell Transplant*, 17(4):383-95.

Espejo, E.F., Montoro, R.J., Armengol, J.A., Lopez-Barneo, J., 1998, Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron*, 20(2):197-206.

Erecinska, M., Silver, I.A., 2001, Tissue oxygen tension and brain sensitivity to Hypoxia. *Respir Physiol*, 128(3):263-76.

Fakhoury, M., 2016, Immune-mediated processes in neurodegeneration: where do we stand? *J Neurol*, 263(9):1683-701.

Ferger, B., Leng, A., Mura, A., Hengerer, B., Feldon, J., 2004, Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem*, 89(4):822-33.

Fidone, S.J., González, C., 1986. Initiation and control of chemoreceptor stimulation. *Handbook of Physiology. The respiratory system, Vol III*:313-362.

Fink, J.S., Schumacher, J.M., Ellias, S.L., Palmer, E.P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H.S., Dempsey, P.K., Fischman, A.J., Raineri, R., Manhart, C., Dinsmore, J., Isacson, O., 2000, Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*, 9(2):273-8.

Finsen, B., Poulsen, P.H., Zimmer, J., 1988, Xenografting of fetal mouse hippocampal tissue to the brain of adult rats: effects of cyclosporin A treatment. *Exp Brain Res*, 70(1):117-33.

Finsen, B., Oteruelo, F., Zimmer, J., 1988, Immunocytochemical characterization of the cellular immune response to intracerebral xenografts of brain tissue. *Prog Brain Res*, 78:261-70.

Finsen, B., Pedersen, E.B., Sørensen, T., Hokland, M., Zimmer, J., 1990, Immune reactions against intracerebral murine xenografts of fetal hippocampal tissue and cultured cortical astrocytes in the adult rat. *Prog Brain Res*, 82:111-28.

Finsen, B., Sørensen, T., Castellano, B., Pedersen, E.B., Zimmer, J., 1991, Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol*, 32(2):159-83.

Finsen, B., Sørensen, T., González, B., Castellano, B., Zimmer, J., 1991, Immunological reactions to neural grafts in the central nervous system. *Restor Neurol Neurosci*, 2(4):271-82.

Fischer, H.G., Bielinsky, A.K., 1999, Antigen presentation function of brain-derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int Immunol*, 11(8):1265-74.

Fornai, F., Schluter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., Sudhof, T.C., 2005, Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9):3413-8.

Forno, L.S., 1992, Neuropathologic features of Parkinson's, Huntington's, and Alzheimer's diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 11; 648:6-16.

Franklin, K. B. J., Paxinos, G., 1997. The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*.

Freed, B.M., Stevens, C., Zhang, G., Rosano, T.G., Lempert, N., 1988, A comparison of the effects of cyclosporine and steroids on human T lymphocyte responses. *Transplant Proc*, 20 (2 Suppl 2):233-9.

Freed, C. R., Breeze, R. E., Rosenberg, N. L., Schneck, S. A., Kriek, E., Qi, J. X., Lone, T., Zhang, Y. B., Snyder, J. A., Wells, T. H., y col., 1992, Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 327(22):1549-55.

Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S., 2001, Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 344(10):710-9.

Freeman, T.B., Wojak, J.C., Brandeis, L., Michel, J.P., Pearson, J., Flamm, E.S., 1988, Cross-species intracerebral grafting of embryonic swine dopaminergic neurons. *Prog Brain Res*, 78:473-7.

Freeman, T.B., Brundin, P., 2006. Important Aspects of Surgical Methodology for Transplantation in Parkinson's disease. Kluwer Academic/Plenum Publishers ed. Springer, London, England.

Freeman, T. B., Olanow, C. W., Hauser, R. A., Nauert, G. M., Smith, D. A., Borlongan, C. V., Sanberg, P. R., Holt, D. A., Kordower, J. H., Vingerhoets, F. J., y col., 1995, Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 38(3):379-88.

Freeman, T.B., Cicchetti, F., Bachoud-Lévi, A.C., Dunnett, S.B., 2011, Technical factors that influence neural transplant safety in Huntington's disease. *Exp Neurol*, 227(1):1-9.

Furuya, T., Hayakawa, H., Yamada, M., Yoshimi, K., Hisahara, S., Miura, M., Mizuno, Y., Mochizuki, H., 2004, Caspase-11 mediates inflammatory dopaminergic cell death in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Journal Neuroscience*, 24(8):1865-72.

Galatioto, S., 1996, Immunohistochemical findings in Huntington's Chorea: report of 9 cases. *Pathologica*, 88(6):491-9.

Gash, D.M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., Hoffer, B.J., Gerhardt, G.A., 1996, Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380(6571):252-5.

Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B., Brooks, D.J., 2006, In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21(2):404-12.

Gerard, M., Deleersnijder, A., Daniëls, V., Schreurs, S., Munck, S., Reumers, V., Pottel, H., Engelborghs, Y., Van den Haute, C., Taymans, J.M., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2010, Inhibition of FK506 binding proteins reduces alpha-synuclein aggregation and Parkinson's disease-like pathology. *J Neurosci*, 30(7):2454-63.

German, D.C., Schlusberg, D.S., Woodward, D.J., 1983, Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: from mouse to man. *J Neural Transm*, 57(4):243-54.

Gerlach, M., Riederer, P., 1996, Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*, 103(8-9):987-1041.

Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Bousquet, M., Levesque, D., Rouillard, C., Cicchetti, F., 2009, Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and alpha-synuclein inclusions. *J Neurochem* 109(5):1469-82.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010, Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6):918-34.

Gonzalez-Perez, O., Alvarez-Buylla, A., 2011, Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev*, 67(1-2):147-56.

Gould, D.S., Auchincloss, H. Jr., 1999, Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today*, 20(2):77-82.

Hanisch, U.K., 2002, Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2):140-55.

Hanisch, U.K., Kettenmann, H., 2007, Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10 (11):1387-94.

Hansen, J.T., Kordower, J.H., Fiandaca, M.S., Jiao, S.S., Notter, M.F., Gash, D.M., 1988, Adrenal medullary autografts into the basal ganglia of Cebus monkeys: graft viability and fine structure. *Exp Neurol*, 102(1):65-75.

Hart, D.N., Fabre, J.W., 1981, Antibody response after alloimmunization with heart tissue in the rat. Characterization of the autoantibodies. *Transplantation*, 31(3):167-73.

He, F., Sun, Y.E., 2007, Glial cells more than support cells?. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(4):661-5.

Heikkila, R.E., Hess, A., Duvoisin, R.C., 1984, Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, 224 (4656):1451-3.

Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., Carrillo-Jiménez, A., Oliva-Martín, M.J., García-Revilla, J., García-Quintanilla, A., de Pablos, R.M., Venero, J.L., 2015, Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, 9:312.

Hickey, W.F., Hsu, B.L., Kimura, H., 1991, T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*, 28(2):254-60.

Hidalgo-Figueroa, M., Bonilla, S., Gutiérrez, F., Pascual, A., López-Barneo, J., 2012, GDNF is predominantly expressed in the PV+ neostriatal interneuronal ensemble in normal mouse and after injury of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci*, 32(3):864-72.

Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009, Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *Lancet Neurol*, 8:382-97.

Hirsch, E.C., Vyas, S., Hunot, S., 2012, Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 18 Suppl 1:S210-2.

Honey, C.R., Charlton, H.M., Wood, K.J., 1991, Rat brain xenografts reverse hypogonadism in mice immunosuppressed with anti-CD4 monoclonal antibody. *Exp Brain Res*, 85(1):149-52.

Honey, C.R., Shen, H., 1999, Immunosuppression for neural xenografts: a comparison of cyclosporin and anti-CD25 monoclonal antibody. *J Neurosurg*, 91(1):109-13.

Hovakimyan, M., Müller, J., Wree, A., Ortinou, S., Rolfs, A., Schmitt, O., 2012, Survival of transplanted human neural stem cell line (ReNcell VM) into the rat brain with and without immunosuppression. *Ann Anat*, 194(5):429-35.

Hurley, S.D., O'Banion, M.K., Song, D.D., Arana, F.S., Olschowka, J.A., Haber, S.N., 2003, Microglial response is poorly correlated with neurodegeneration following chronic, low-dose MPTP administration in monkeys. *Experimental Neurology*, 184(2):659-68.

Hutter-Saunders, J.A., Mosley, R.L., Gendelman, H.E., 2011, Pathways towards an effective immunotherapy for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*, 11(12):1703-15.

Hricik, D.E., Almawi, W.Y., Strom, T.B., 1994, Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation. *Transplantation*, 57(7):979-89.

Isacson, O., Deacon, T.W., Pakzaban, P., Galpern, W.R., Dinsmore, J., Burns, L.H., 1995, Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med*, 1(11):1189-94.

Isono, M., Poltorak, M., Kulaga, H., Adams, A.J., Freed, W.J., 1993, Certain host-donor strain combinations do not reject brain allografts after systemic sensitization. *Exp Neurol*, 122(1):48-56.

Jablonska, B., Aguirre, A., Raymond, M., Szabo, G., Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.L., Song, H., Gallo, V., 2010, Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat Neurosci*, 13(5):541-50.

Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M., Snyder, S.H., 1985, Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(7):2173-7.

Jellinger, K.A., 1999, Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms?. *J Neural Transm Suppl*, 56:1-29.

Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., Limousin, P., Quinn, N., Foltynie, T., 2014, Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol*, 71(1):83-7.

Kettenmann, H., 2006, Triggering the brain's pathology sensor. *Nat Neurosci*, 9(12):1463-4.

Kettenmann, H., 2007, Neuroscience: the brain's garbage men. *Nature*, 446(7139):987-9.

Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011, Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91(2):461-553.

Khoo, M.L., Tao, H., Meedeniya, A.C., Mackay-Sim, A., Ma, D.D., 2011, Transplantation of neuronal-primed human bone marrow mesenchymal stem cells in hemiparkinsonian rodents. *PLoS One*, 6(5). e19025

Kirik, D., Georgievska, B., Björklund, A., 2004, Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 7(2):105-10.

Klaidman, L.K., Adams, J. D., Jr., Leung, A. C., Kim, S. S., Cadenas, E., 1993, Redox cycling of MPP<sup>+</sup>: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*, 15(2):169-79.

Kordower, J. H., Emborg, M.E., Bloch, J., Ma, S. Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E. Y., Palfi, S., Roitberg, B.Z., Brown, W.D., Holden, J.E., Pyzalski, R., Taylor, M.D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Deglon, N., Aebischer, P., 2000, Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 290(5492):767-73.

Kreutzberg, G.W., 1996, Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19:312-318.

Krystkowiak, P., Gaura, V., Labalette, M., Rialland, A., Remy, P., Peschanski, M., Bachoud-Lévi, A.C., 2007, Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease. *PLoS One*, 2(1):e166.

Kunicka, J.E., Talle, M.A., Denhardt, G.H., Brown, M., Prince, L.A., Goldstein, G., 1993, Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol*, 149(1):39-49.

Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., Irwin, I., 1983, Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science*, 219: 979-980.

Langston, J.W., Langston, E.B., Irwin, I., 1984, MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates: clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*, 100:49-54.

Larsson, L.C., Frielingsdorf, H., Mirza, B., Hansson, S.J., Anderson, P., Czech, K.A., Strandberg, M., Widner, H., 2001, Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol*, 172(1):100-14.

Leitner, M.L., Wang, L.H., Osborne, P.A., Golden, J.P., Milbrandt, J., Johnson, E.M.Jr., 2005, Expression and function of GDNF family ligands and receptors in the carotid body. *Exp Neurol*, 191:S68-79.

Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Przedborski, S., 1999, Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*, 5(12):1403-9.

Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D., y col., 1990, Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247(4942):574-7.

Lindvall, O., Widner, H., Rehnström, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., y col., 1992, Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol*, 31(2):155-65.

Lindvall, O., Björklund, A., 2004, Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx*, 1(4):382-93.

Liu W, Li XC., 2010, An overview on non-T cell pathways in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*, 15(4):422-6.

Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J.R., Urena, J., Gonzalez, C., 1988, Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by PO<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells. *Science*, 241(4865):580-2.

Lopez-Barneo, J., Pardal, R., Ortega-Saenz, P., 2001, Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol*, 63:259-287.

Lopez-Barneo, J., 2003, Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol*, 13:493-499.

Lopez-Barneo, J., Ortega-Saenz, P., Pardal, R., Pascual, A., Piruat, J. I., 2008, Carotid body oxygen sensing. *Eur Respir J*, 32(5):1386-98.

López-Barneo, J., Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R., Villadiego, J., Toledo-Aral, J.J., 2009, The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *J Neural Transm (Vienna)*, 116(8):975-82.

Lund, R.D., Rao, K., Hankin, M.H., Kunz, H.W., Gill, T.J., 1987, Transplantation of retina and visual cortex to rat brains of different ages. Maturation, connection patterns, and immunological consequences. *Ann N Y Acad Sci*, 495:227-41.

Luo, J., Sun, L., Lin, X., Liu, G., Yu, J., Parisiadou, L., Xie, C., Ding, J., Cai, H., 2014, A calcineurin- and NFAT-dependent pathway is involved in  $\alpha$ -synuclein-induced degeneration of midbrain dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet*, 23(24):6567-74.

Luquin, M.R., Montoro, R.J., Guillen, J., Saldise, L., Insausti, R., Del Rio, J., Lopez-Barneo, J., 1999, Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron*, 22(4):743- 50.

Lynch, M.A., Mills, K.H., 2012, Immunology meets neuroscience--opportunities for immune intervention in neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun*, 26(1):1-10.

Marion, D.W., Pollack, I.F., Lund, R.D., 1990, Patterns of immune rejection of mouse neocortex transplanted into neonatal rat brain, and effects of host immunosuppression. *Brain Res*, 519(1-2):133-43.

Markey, S.P., Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S., Herkenham, M.A., 1984, Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause druginduced parkinsonism. *Nature* 311(5985):464-7.

Mason, D.W., Charlton, H.M., Jones, A.J., Lavy, C.B., Puklavec, M., Simmonds, S.J., 1986, The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience*, 19(3):685-94.

Mason, D.W., Morris, P.J., 1986, Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu Rev Immunol*, 4:119-45.

Mathieux, E., Nerrière-Daguin, V., Lévêque, X., Michel-Monigadon, D., Durand, T., Bonnamain, V., Ménoret, S., Anegon, I., Naveilhan, P., Neveu, I., 2014, IgG response to intracerebral xenotransplantation: specificity and role in the rejection of porcine neurons. *Am J Transplant*, 14(5):1109-19.

Matsuda, S., Shibasaki, F., Takehana, K., Mori, H., Nishida, E., Koyasu, S., 2000, Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep*, 1(5):428-34.

Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H., Ogawa, N., 1996, Cyclosporin A attenuates degeneration of dopaminergic neurons induced by 6-hydroxydopamine in the mouse brain. *Brain Res*, 733:101–104.

McAllister, A.K., Van de Water, J., 2009, Breaking boundaries in neural-immune interactions. *Neuron*, 64(1):9-12.

McCoy, M.K., Martinez, T.N., Ruhn, K.A., Szymkowski, D.E., Smith, C.G., Botterman, B.R., Tansey, K.E., Tansey, M.G., 2006, Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 26(37):9365-75.

- McGeer, P.L., Itagaki, S., Akiyama, H., McGeer, E.G., 1988, Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol*, 24(4):574-6.
- McGeer, P.L., Kawamata, T., Walker, D.G., Akiyama, H., Tooyama, I., McGeer, E.G., 1993, Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*, 7 (1):84-92.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1998, Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 12 Suppl 2:S1-6.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2004, Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1035:104-16.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2008, Glial reaction in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23:474-483.
- McGregor, K.H., Gil, J., Lahiri, S., 1984, A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol*, 57(5):1430-8.
- Medawar, P.B., 1948, Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, Feb, 29(1):58-69.
- Menn, B., 2006, Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *J Neurosci*, 26:7907-7918.
- Meredith, G.E., Sonsalla, P.K., Chesselet, M.F., 2008, Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol*, 115(4):385-98.
- Minguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G. R., Toledo-Aral, J.J., Ortega-Moreno, A., Mendez-Ferrer, S., Martin-Linares, J.M., Katati, M.J., Mir, P., Villadiego, J., Meersmans, M., Perez-Garcia, M., Brooks, D.J., Arjona, V., Lopez-Barneo, J., 2007, Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78(8):825-31.
- Mizoguchi, Y., Monji, A., Kato, T., Seki, Y., Gotoh, L., Horikawa, H., Suzuki, S.O., Iwaki, T., Yonaha, M., Hashioka, S., Kanba, S., 2009, Brain-derived neurotrophic factor induces sustained elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in rodent microglia. *J Immunol*, 183(12):7778-86.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., Nagatsu, T., 1994b, Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 165(1- 2):208-10.

- More, S.V., Kumar, H., Kim, I.S., Song, S.Y., Choi, D.K., 2013, Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm*, 2013:952375.
- Mount, M.P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P.D., Faucher, S., Slack, R., Anisman, H., Hayley, S., Park, D.S., 2007, Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 27(12):3328-37.
- Muñoz-Manchado, A.B., 2011. Tesis doctoral: Acción trófica de trasplantes de cuerpo carotídeo en un modelo crónico y sistémico de parkinsonismo. Implicaciones terapéuticas. Departamento de Fisiología Médica y Biofísica. Universidad de Sevilla.
- Muñoz-Manchado, A.B., Villadiego, J., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J.L., Echevarría, M., López-Barneo, J., Toledo-Aral, J.J., 2013, Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 34(3):902-15.
- Muñoz-Manchado, A.B., Villadiego, J., Romo-Madero, S., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Rodríguez-Gómez, J.A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J.L., Echevarría, M., López-Barneo, J., Toledo-Aral, J.J., 2016, Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice. *J Neurochem*, 136(2):373-87.
- Napoli, I., Neumann, H., 2009, Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 158(3):1030-1038.
- Narassimhan K., 2005, Brain's guard cells show their agility. *Nature Neurosci*, 8(6):752-8.
- Nicklas, W.J., Vyas, I., Heikkila, R.E., 1985, Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sciences*, 36(26):2503-8.
- Nolan, Y.M., Sullivan, A.M., Toulouse, A., 2013, Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol Med*, 19 (3):187-96.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Arbizu, J., Gimenez-Amaya, J.M., 2002, The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci*, 17:51-5.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Goetz, C.G., Marin, C., Kordower, J.H., Rodriguez, M., 2010, Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 16:653-61.
- O'Callaghan J.P., Sriram, K., 2005, Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Exp Opin Drug Safety*, 4:433-442.

Olanow, C.W., Goetz, C.G., Kordower, J.H., Stoessl, A.J., Sossi, V., Brin, M.F., Shannon, K.M., Nauert, G.M., Perl, D.P., Godbold, J., Freeman, T.B., 2003, A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 54(3):403-14.

Olanow, C.W., Kordower, J.H., 2009, Modeling Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 66(4):432-6.

Pachter, J.S., de Vries, H.E., Fabry, Z., 2003, The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(6):593-604.

Pardal, R., Ortega-Saenz, P., Duran, R., Lopez-Barneo, J., 2007, Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*, 131(2):364-77.

Pakzaban, P., Isacson, O., 1994, Neural xenotransplantation: reconstruction of neuronal circuitry across species barriers. *Neuroscience*, 62(4):989-1001.

Pedersen, E.B., Poulsen, F.R., Zimmer, J., Finsen, B., 1995, Prevention of mouse-rat brain xenograft rejection by a combination therapy of cyclosporin A, prednisolone and azathioprine. *Exp Brain Res*, 106(2):181-6.

Pedersen, E.B., Zimmer, J., Finsen, B., 1997, Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood-brain barrier leakage. *Neuroscience*, 78(3):685-701.

Perlow, M. J., Freed, W. J., Hoffer, B. J., Seiger, A., Olson, L., Wyatt, R. J., 1979, Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*, 204(4393):643-7.

Petroske, E., Meredith, G.E., Callen, S., Totterdell, S., Lau, Y.S., 2001, Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience*, 106(3):589-601.

Piccini, P., Brooks, D. J., Bjorklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., y Lindvall, O., 1999, Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*, 2(12):1137-40.

Piltonen, M., Beshpalov, M.M., Ervasti, D., Matilainen, T., Sidorova, Y.A., Rauvala, H., Saarma, M., Männistö, P.T., 2009, Heparin-binding determinants of GDNF reduce its

tissue distribution but are beneficial for the protection of nigral dopaminergic neurons. *Exp Neurol*, 219(2):499-506.

Pollack, I.F., Lund, R.D., Rao, K., 1990, MHC antigen expression and cellular response in spontaneous and induced rejection of intracerebral neural xenografts in neonatal rats. *Restor Neurol Neurosci*, 1(5):347-60.

Porzionato, A., Macchi, V., Parenti, A., De Caro, R., 2008, Trophic factors in the carotid body. *Int Rev Cell Mol Biol*, 269:1-58.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R., Akram, M., 2001, The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem*, 76(5):1265-74.

Przedborski, S., Vila, M., 2003, The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991:189-98.

Rangasamy, S.B., Soderstrom, K., Bakay, R.A., Kordower, J.H., 2010, Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. *Prog Brain Res*, 184:237-64.

Ramsay, R.R., Salach, J. I., Singer, T.P., 1986, Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD<sup>+</sup>-linked substrates by MPP<sup>+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun*, 134(2):743-8.

Ramsay, R.R., Singer, T.P., 1986, Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem*, 261(17):7585-7.

Reale, M., Iarlori, C., Thomas, A., Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M., Onofri, M., 2009a, Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*, 23: 55-63.

Redmond, D. E., Sladek, J. R., Jr., Roth, R. H., Collier, T. J., Elsworth, J. D., Deutch, A.Y., Haber, S., 1986, Fetal neuronal grafts in monkeys given methylphenyltetrahydropyridine. *Lancet*, 1(8490):1125-7.

Rocha, S.M., Cristovão, A.C., Campos, F.L., Fonseca, C.P., Baltazar, G., 2012, Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiol Dis*, Sep 47(3):407-15.

Rodrigues, R.W., Gomide, V.C., Chadi, G., 2001, Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. *Int J Neurosci*, 109: 91–126.

Rosenblad, C., Martinez-Serrano, A., Bjorklund, A., 1998, Intrastratial glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 82(1):129-37.

Rozas, G., López-Martín, E., Guerra, M.J., Labandeira-García, J.L., 1998, The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods*, 83, 165–175.

Sauer, H., Oertel, W. H., 1994, Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastratial terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59(2):401-15.

Scalzo, P., Kümmer, A., Cardoso, F., Teixeira, A.L., 2009, Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*, 216 (1-2):122-5.

Schapira, A.H., 2009, Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 30(1):41-7.

Schintu, N., Frau, L., Ibba, M., Garau, A., Carboni, E., Carta, A.R., 2009, Progressive dopaminergic degeneration in the chronic MPTPp mouse model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, Aug 16(2):127-39.

Schmidt, N., Ferger, B., 2001, Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 108(11):1263-82.

Schober, A., 2004, Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*, 318(1):215-24.

Sedelis, M., Schwarting, R. K., Huston, J. P., 2001, Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 125(1-2):109-25.

Shimoji, M., Zhang, L., Mandir, A.S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2005, Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 134(1):103-8.

Shults, C.W., 2006, Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(6):1661-8.

- Sloan, D.J., Baker, B.J., Puklavec, M., Charlton, H.M., 1990, The effect of site of transplantation and histocompatibility differences on the survival of neural tissue transplanted to the CNS of defined inbred rat strains. *Prog Brain Res*, 82:141-52.
- Sloan, D.J., Wood, M.J., Charlton, H.M., 1991, The immune response to intracerebral neural grafts. *Trends Neurosci*, 14(8):341-6.
- Sofroniew, M.V., 2005, Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*, 11(5):400-7.
- Sofroniew, M.V., 2009, Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32(12):638-47.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010, Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119 (1):7-35.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997, Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645):839-40.
- Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A., Miller, D.B., Luster, M.I., O'Callaghan, J.P., 2002, Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J*, 16(11):1474-6.
- Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A., Miller, D.B., Luster, M.I., O'Callaghan, J.P., 2006, Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. *FASEB J*, 20(6):670-82.
- Stanimirovic, D.B., McCarron, R.M., Spatz, M., 1994, Dexamethasone down-regulates endothelin receptors in human cerebrovascular endothelial cells. *Neuropeptides*, 26(3):145-52.
- Stea, A., Jackson, A., Macintyre, L., Nurse, C.A., 1995, Long-term modulation of inward currents in O<sub>2</sub> chemoreceptors by chronic hypoxia and cyclic AMP in vitro. *J Neurosci*, 15:2192-21202.
- Streit, W.J., 2002, Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS, *Glia*, 40:133-139.
- Sulzer, D., 2007, Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 30(5):244-50.

- Takagi, S., Hayakawa, N., Kimoto, H., Kato, H., Araki, T., 2007, Damage to oligodendrocytes in the striatum after MPTP neurotoxicity in mice. *J Neural Transm*, 114(12):1553-7.
- Tamburrino, A., Churchill, M.J., Wan, O.W., Colino-Sanguino, Y., Ippolito, R., Bergstrand, S., Wolf, D.A., Herz, N.J., Sconce, M.D., Björklund, A., Meshul, C.K., Decressac, M., 2015, Cyclosporin promotes neurorestoration and cell replacement therapy in pre-clinical models of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 3:84.
- Tandé, D., Hoglinger, G., Debeir, T., Freundlieb, N., Hirsch, E.C., Francois, C., 2006, New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain*, 129: 1194–200.
- Tandrup, T., Gundersen, H.J., Jensen, E.B., 1997, The optical rotator. *J Microsc*, 186(Pt 2):108-20.
- Tansey, M.G., Goldberg, M.S., 2010, Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 37(3):510-8.
- Tedeschi, B., Barrett, J.N., Keane, R.W., 1986, Astrocytes produce interferon that enhances the expression of H-2 antigens on a subpopulation of brain cells. *J Cell Biol*, 102(6):2244-53.
- Tipton, K.F., Singer, T.P., 1993, Advances in our understanding of the mechanisms of neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem*, 61:1191-1206.
- Toledo-Aral, J. J., Mendez-Ferrer, S., Pardal, R., Lopez-Barneo, J., 2002, Dopaminergic cells of the carotid body: physiological significance and possible therapeutic applications in Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, 57(6):847-53.
- Toledo-Aral, J.J., Mendez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarria, M., Lopez-Barneo, J., 2003, Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci*, 23(1):141-8.
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.F., Ogren, S.O., Young, D., Hoffer, B.J., Olson, L., 1995, Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373(6512):335-9.
- Trotter, J., Karram, K., Nishiyama, A., 2010, NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev*, 63(1-2):72-82.

Urena, J., Fernandez-Chacon, R., Benot, A.R., Alvarez de Toledo, G.A., Lopez-Barneo, J., 1994, Hypoxia induces voltage-dependent  $Ca^{2+}$  entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21):10208-11.

Van der Perren, A., Macchi, F., Toelen, J., Carlon, M.S., Maris, M., de Loor, H., Kuypers, D.R., Gijssbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2015, FK506 reduces neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in an  $\alpha$ -synuclein-based rat model for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 36(3):1559-68.

Villadiego, J., Mendez-Ferrer, S., Valdes-Sanchez, T., Silos-Santiago, I., Farinas, I., Lopez-Barneo, J., Toledo-Aral, J. J., 2005, Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J Neurosci*, 25(16):4091-8.

Villadiego Luque, J., 2007. Tesis doctoral: GDNF y cuerpo carotídeo: implicaciones funcionales y uso en terapia celular. Departamento de Fisiología Médica y Biofísica. Universidad de Sevilla.

Volta, M., Milnerwood, A.J., Farrer, M.J., 2015, Insights from late-onset familial parkinsonism on the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 14(10):1054-64.

Wekerle, H., Schwab, M., Linington, C., Meyermann, R., 1986, Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol*, 16(12):1551-7.

Wennberg, L., Czech, K.A., Larsson, L.C., Mirza, B., Bennet, W., Song, Z., Widner, H., 2001, Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation*, 71(12):1797-806.

West, M. J., 1993, New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*, 14(4):275-85.

Wider, C., Wszolek, Z.K., 2008, Etiology and pathophysiology of frontotemporal dementia, Parkinson disease and Alzheimer disease: lessons from genetic studies. *Neurodegener Dis*, 5(3-4):122-5.

Widner, H., Brundin, P., 1988, Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis., *Brain Res*, 472(3):287-324.

Widner, H., Tetrad, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Björklund, A., Lindvall, O., Langston, J.W., 1992, Bilateral fetal mesencephalic grafting in two

patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med*, 327(22):1556-63.

Widner, H., Brundin, P., 1993, Sequential intracerebral transplantation of allogeneic and syngeneic fetal dopamine-rich neuronal tissue in adult rats: will the first graft be rejected?. *Cell Transplant*, 2(4):307-17.

Wijeyekoon, R., Barker, R.A., 2009, Cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792(7):688-702.

Williams, J.L., Holman, D.W., Klein, R.S., 2014, Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci*, 28;8:154.

Wood, M.J., Sloan, D.J., Dallman, M.J., Charlton, H.M., 1992, A monoclonal antibody to the interleukin-2 receptor enhances the survival of neural allografts: a time-course study. *Neuroscience*, 49(2):409-18.

Wood, M.J., Sloan, D.J., Wood, K.J., Charlton, H.M., 1996, Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience*, 70(3):775-89.

Wong, W.T., 2013, Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci*, 7:22.

Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.K., Ischiropoulos, H., Przedborski, S., 2002, Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci*, 22(5):1763-71.

Yuen, C.M., Sun, C.K., Lin, Y.C., Chang, L.T., Kao, Y.H., Yen, C.H., Chen, Y.L., Tsai, T.H., Chua, S., Shao, P.L., Leu, S., Yip, H.K., 2011, Combination of cyclosporine and erythropoietin improves brain infarct size and neurological function in rats after ischemic stroke. *J Transl Med*, 24; 9:141.

Yurek, D.M. Sladek, J.R., 1990, Dopamine cell replacement: Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 13: 415-440.

Zimmer, J., Finsen, B., Sørensen, T., Poulsen, P.H., 1988, Xenografts of mouse hippocampal tissue. Exchange of laminar and neuropeptide specific nerve connections with the host rat brain. *Brain Res Bull*, 20(3):369-79.

Zlotnik, A., Spittau, B., 2014, GDNF fails to inhibit LPS-mediated activation of mouse microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 270:22–28.