



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ESTUDIO DE LA NEUROGENESIS EN EL
HIPOCAMPO INDUCIDA POR LA
COADMINISTRACIÓN DE L-DOPA/MELATONINA
EN RATAS CON EL MODELO EXPERIMENTAL DE
PARKINSON**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A :

SUSANA ARIADNA SÁNCHEZ SORIA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. VERONICA ANAYA MARTINEZ**

2016

Los Reyes Iztacala, Tlalneantla, Estado de México



Universidad Nacional
Autónoma de México

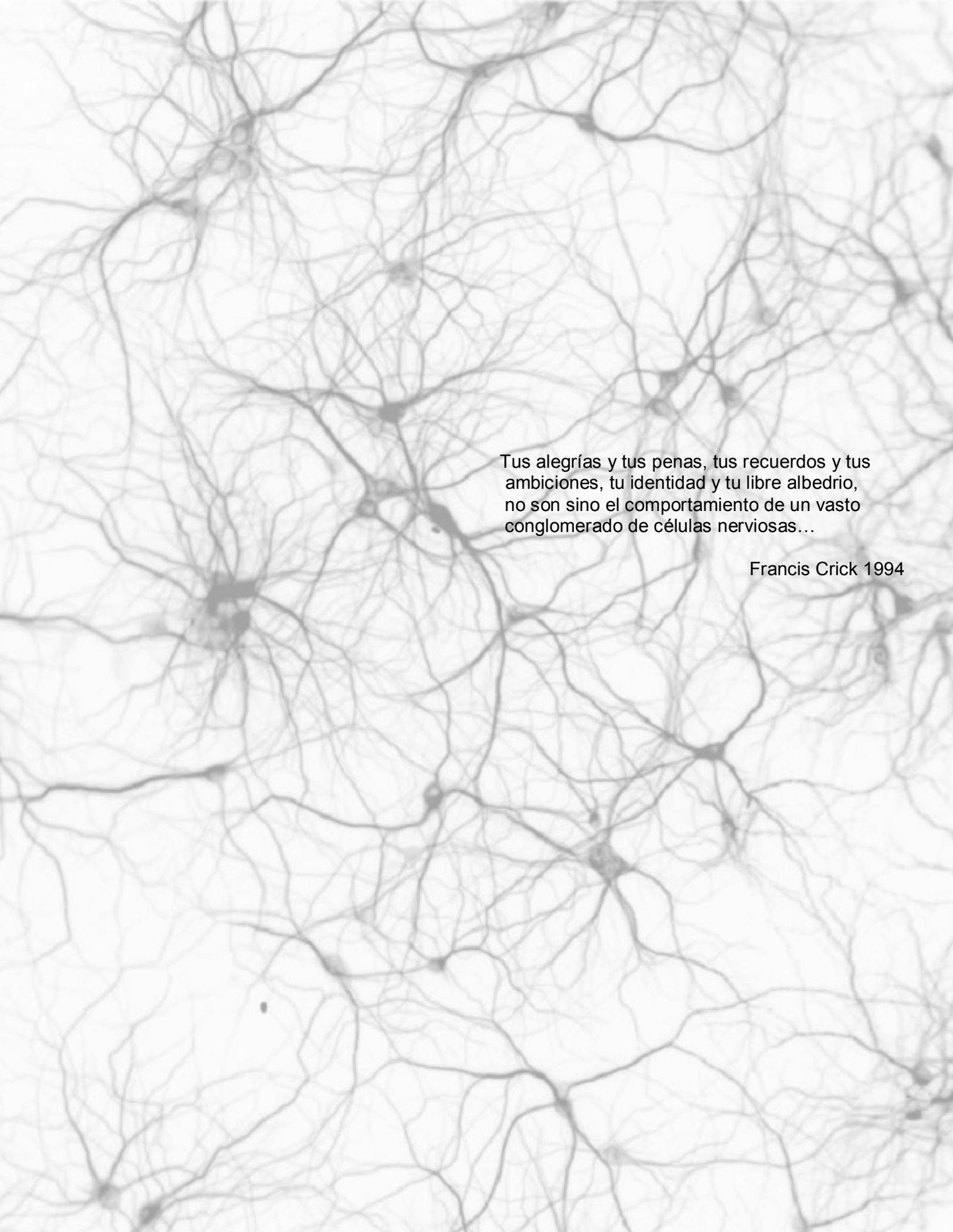


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Tus alegrías y tus penas, tus recuerdos y tus
ambiciones, tu identidad y tu libre albedrío,
no son sino el comportamiento de un vasto
conglomerado de células nerviosas...

Francis Crick 1994

Agradecimientos

A mis papas Susan y Moy, gracias por darme todo para poder crecer como persona por su ejemplo y por todo eso que me han inculcado, por su amor incondicional y por aguantar uno que otro sustito, pero sobre todo por ayudarme a levantarme siempre y seguir adelante.

A mi hermana Lin, por que a pesar de que somos diferentes no hay persona en el mundo con que me entienda mejor y con quien pueda hacer tantas locuras, por las miles de desveladas, los consejos y el apoyo.

A mis abuelitos, a mis tíos mis primos, mis sobrinas y a toda mi familia que me apoya siempre y que está ahí incondicionalmente gracias por su cariño y su infinito apoyo.

A Fer , por que no solo eres mi mejor amigo en el mundo, eres mi hermano por caminar siempre juntos en las buenas en las malas en las peores, por todos los secretos que guardamos, las veces que hemos reído y llorado juntos por que nadie me conoce como mejor que tú, te quiero muchísimo.

A Vero, por tus asesorías por tu apoyo y por tu guía durante este trabajo, gracias a ti crecí como estudiante y me llevo muchísimos nuevos conocimientos y experiencias satisfactorias. Mil gracias., te admiro muchísimo como persona pero también como mujer, gracias por tu amistad fuera del laboratorio, por todos los consejos y golpes que me ayudaron a ser mejor te quiero mucho.

A María Rosa, gracias por aguantarme tanto, por ser la persona tan genial que eres por todos los consejos y por todo tu apoyo no solo en lo académico, por ser un gran ejemplo y una gran mujer te quiero mucho .

A las Damitas de los Viernes: May y Montse niñas las quiero muchísimo, gracias por su amistad y su apoyo por todos los buenos momentos dentro y fuera del lab.

A Alberto ZG, que te puedo decir te quiero agradecer inmensamente todo lo que me enseñaste en este tiempo, gracias por tu infinita paciencia, por tu apoyo y por tu guía, por los consejos y por hacerme ver mis errores, por todo lo compartido y sobre todo por quererme tanto yo también te quiero mucho.

A Nalle, Marisol, Perritas las quiero muchísimo gracias por su amistad consejo y loqueras la uni no hubiera sido igual sin ustedes.

A Ana y Enrique, muchas gracias por todos sus comentarios, por haberme brindado su ayuda durante el tiempo que estuve en el laboratorio, gracias a ustedes tuve una cálida estancia. Ana gracias por tu amistad y por los todos los buenos momentos te quiero.

A Iván, monstreque te extraño mucho gracias por tu amistad y todo lo bonito que pasamos juntos.

A Arturo Conejo amigo te quiero muchísimo, lo logramos, gracias por el tiempo los consejos y todos los buenos tiempos compartidos y los que nos faltan.

A Toñito, Por tu amistad y por todas las risas y perversiones juntas, por hacerme las clases más divertidas te quiero amigo.

A todos mis amigos, por estar a mi lado apoyándome y pasando buenos momentos juntos.

A Paty y Chucho, por todo su apoyo en mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeritos del laboratorio, Abraham, Javier, Carlos, Miguel, todos los nuevos y todos los que ya no están por el gran equipo que hemos formado y por las risas los quiero perdón por molestarlos tanto.

A Laura muchas gracias por tu apoyo, y por sus comentarios constructivos sobre la tesis.

El apoyo financiero para la realización del trabajo de investigación: proyecto PAPCA 2014 "CAMBIOS EN LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICAS SOBRE INTERNEURONAS COLINÉRGICAS ESTRIATALES" (Clave: FESI-DIP-PAPCA-2014-18).

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hydroxydopamine, 2,4,5- Trihidroxifeniletilamina	GSH	Glutación reducido
ATP	Adenosin Trifosfato	GSH-Px	Glutación Peroxidasa
BDNF	Factor derivado de cerebro	IGF	Factores de crecimiento insulínico
BH4	Tetrahidrobiopterina	IP	Intraperitoneal
BHE	Barrera Hematoencefálica	L-DOPA	L-3,4- Dihidroxifenilalanina
BO	Bulbo Olfatorio	LMol	stratum lacunosum moleculare
BrdU	bromodesoxiuridina	LTP	Potenciación a largo plazo
CA	Cuerno de Admón.	MAO-A	Monoaminoxidasa A
CAT	Catalasa	MAO-B	Monoaminoxidasa B
CE	Corteza entorrinal	MPTP	1-Metil-4-(2,5-dihidroxi-1H- 4H-piridin-4-yl)piridina
CG	Células granulares	MT	Microtúbulos
CNTF	Ciliary neurotrophic factor	NE	Núcleo Estriado
COMT	Catecol-O- Metiltransferasa	NeuN	Marcador neuronal
CoQ	Co-enzima Q	NGF	Factor de crecimiento nervioso
Cx	Corteza cerebral	NMDA	N-metil-Daspartato
DA	Dopamina	NO	Oxido nítrico
DAT	Transportador de Dopamina	NSQ	Núcleo Supraquiasmático
DCX	Doublecortin	ONOO- H₂O₂	Anion peroxinitrito
DDC	Descarboxilasa	Or	Oriens stratum
DOPAC	Ácido Dihidroxifenilacético	PLP	Piridoxal 5'fosfato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	Py	Piramidale stratum
EN	Enfermedades Neurodegenerativas	Rad	Stratum radiatum
EP	Enfermedad de Parkinson	RL	Radicales Libres
ERO-ROS	Especies Reactivas de Oxígeno	SLu	stratum lucidem
FGF	Factor de crecimiento	SN	Sustancia Nigra

	fibroblástico		
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico	SNC	Sustancia Nigra Compacta
GB	Ganglios Basales	SNC	Sistema Nervioso Central
GD	Giro Dentado	SNP	Sistema Nervioso Periférico
GP	Globo Pálido	SNr	Sustancia Nigra Reticular
GPx	Glutación peroxidasa	SOD	Superóxido Dismutasa
GSH	Glutación reducido	TH	Tirosina Hidroxilasa
GSH-Px	Glutación Peroxidasa	ZSG	Zona SubGranular
SC	Colaterales de Schaffer	ZSV	Zona SubVentricular

ÍNDICE

Resumen	9
Introducción	11
Hipocampo Neurogénesis y DA	
BDNF	
BDNF-D3	
Neurogénesis	
Enfermedad de Parkinson	
Tratamiento (L-DOPA)	
Efectos adversos	
Melatonina	
Hipocampo	15
Conexiones	
Tipos células	
Inervación dopaminérgica	
Función	
Hipocampo Neurogénesis y DA	
BDNF	
BDNF- RD3	
Neurogénesis	21
Condiciones de estrés	
Glutamato	
Dopamina	
Serotonina	
GABA (Ácido γ -aminobutírico)	
Factores tróficos	
Neurogénesis, Hipocampo y memoria	
Enfermedad de Parkinson	31
Características	
Degeneración sistema DA	
L-DOPA	
Tratamientos	33
L-DOPA	
Discinesias	
Neurotoxicidad	

Antioxidantes	36
Naturales	
Melatonina	38
Melatonina y Parkinson	39
Justificación	42
Objetivos	42
General	
Particulares	
Materiales y Métodos	43
Animales	
Lesión	
Giro inducido	
Tratamientos BrdU	
Perfusión	
Inmunocitoquímica	
Resultados	46
Conteo de neuronas TH en nigra	
Neuronas en hipocampo	
Neuronas BrdU en ZSV	
Discusión	53
Conclusión	57
Anexos	58
Referencias Bibliográficas	64

Resumen

El giro dentado (GD) es un sitio de producción continua de nuevas neuronas en el hipocampo adulto, recibe entradas de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc). La presencia de dopamina se ha relacionado con la proliferación celular. Por lo tanto, la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc durante la enfermedad de Parkinson puede afectar directamente la neurogénesis del hipocampo adulto. Una de las teorías más aceptadas acerca de la etiología de la enfermedad de Parkinson (EP) es la del estrés oxidativo, sin embargo el tratamiento prolongado con L-DOPA, el fármaco por elección, incrementa el estrés oxidativo y la muerte celular. La administración de L-DOPA como tratamiento de la EP pudiera estar induciendo estrés oxidativo y contribuyendo al deterioro del nicho neurogénico en el GD. La melatonina (hormona natural) muestra propiedades antioxidantes, y disminuye el estrés oxidativo en varios núcleos cerebrales, es probable que al administrarla regule la neurogénesis en el hipocampo.

El presente estudio se analizó la capacidad de la Melatonina (10 mg/kg) para modular la neurogénesis en el hipocampo de ratas con un modelo de la EP comparado con un grupo control, un grupo con L-DOPA (7.5 mg/kg) y un grupo con L-DOPA/Melatonina. Se administró un marcador de neurogénesis, el BrdU, durante el mes de tratamiento farmacológico, y la neurogénesis se juzgó contando en el GD de las neuronas que presentaron doble marca al revelarse la inmunocitoquímica anti BrdU y anti NeuN (marcador neuronal), pues la colocalización es indicio de neuronas formadas durante la administración del marcador, es decir durante el tratamiento farmacológico.

Los resultados de este trabajo muestran que la pérdida de dopamina en la SNc en el modelo experimental de Parkinson, disminuye los niveles de neurogénesis en el hipocampo. La melatonina, y la melatonina en conjunto con la L-DOPA favorecen la neurogénesis en el GD.

Palabras clave: Sustancia Nigra compacta, Melatonina, Hipocampo, Neuronas dopaminérgicas.



INTRODUCCIÓN

La neurogénesis es un proceso complejo que involucra diversas etapas, como la proliferación de las células pluripotenciales, la migración, la diferenciación y la sobrevivencia de las neuronas nuevas, así como la integración de éstas en los circuitos neuronales existentes (Ramírez et al., 2007).

El hallazgo del siglo XX sobre la neurogénesis en el cerebro adulto acaba con uno de los dogmas de la historia de la medicina. La existencia de nichos neurogénicos en la edad adulta abre múltiples expectativas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer o el Parkinson así como la comprensión más exhaustiva de la fisiología cerebral (Segovia y Mora, 2002).

Se han reportado dos regiones en el cerebro adulto donde se lleva a cabo la formación de neuronas nuevas: el bulbo olfatorio y en el GD del hipocampo. Estas neuronas nuevas se diferencian de las células pluripotenciales residentes en la zona subventricular de los ventrículos laterales y de la zona subgranular del GD, respectivamente. Estas dos regiones del cerebro presentan características importantes que permiten que se lleve a cabo el proceso de formación de neuronas nuevas llamado neurogénesis (Rodríguez, 20013).

El hipocampo, en humanos, está localizado en la parte medial del lóbulo temporal del cerebro. Pertenece, junto con el hipotálamo y la amígdala, al circuito límbico del cerebro, Cada una de estas regiones tiene tipos específicos de células y la plasticidad que contribuyen a los procesos de aprendizaje y memoria (Kesner, 2007).

Por otra parte, el hipocampo pertenece a la arquicorteza que, junto con el subículo y el GD, componen la formación hipocampal.

La formación de neuronas nuevas en el hipocampo parece contribuir para evitar una alteración de los circuitos neuronales (Kempermann, 2008). Se sabe que existe una relación entre la activación de las áreas dopaminérgicas y la formación de memoria a largo plazo dependiente del hipocampo (Wittmann et al., 2005).

En el proceso de neurogénesis, la DA juega un papel preponderante (Höglinger et al., 2004). La inervación dopaminérgica hacia el hipocampo se origina de los grupos de células dopaminérgicas del área ventral tegmental (A10) y la sustancia nigra compacta (A9). La parte 'anterior' del hipocampo (CA1, CA3, EC) recibe una aportación dopaminérgica importante de la zona A10 mientras que la región del hipocampo 'posterior' (GD, C3) presenta aferencias dopaminérgicas tanto de A9 y A10, así como de otros grupos celulares. Las aferencias dopaminérgicas llegan a la región del hipocampo principalmente a través de la ruta dorsal (Scatton et al., 1980). Por esta razón la degeneración de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo puede afectar a regiones remotas del cerebro que están inervados por las proyecciones de estas neuronas. El giro dentado (GD), es el sitio de producción continua de nuevas neuronas en el hipocampo adulto, recibe entradas de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN). Por lo tanto, el agotamiento de las neuronas de la SNc durante la enfermedad de Parkinson (EP) o en la configuración experimental de la misma enfermedad puede afectar directamente la neurogénesis del hipocampo (Park y Enikolopov, 2010).

La DA contribuye a la morfogénesis en el desarrollo embrionario, se sintetiza en etapas iniciales del desarrollo al igual que sus receptores y continúa regulando el ciclo celular en el cerebro adulto (Höglinger et al., 2004). El receptor D3 es fuertemente expresado

durante el desarrollo de las zonas de proliferación activa del neuroepitelio y se ha reportado que su expresión continúa en etapas adultas (Diaz et al., 1997). Su expresión va de moderada a densa, también se ha reportado en el GD (Shafer y Levant, 1998), lo que le confiere un papel importante en la inducción de proliferación mediada por DA en las zonas con potencial neurogénico (Höglinger et al., 2004).

Por otra parte, el factor derivado de cerebro (BDNF), también juega un papel importante ya que tiene efectos potentes sobre la supervivencia y la morfología de las neuronas del hipocampo y dopaminérgicas de la SNc, y por tanto su pérdida podría contribuir a la muerte de estas células en la EP (Howells, 2000).

Se ha reportado que el BDNF es responsable de la aparición de los receptores D3 durante el desarrollo y que mantiene su expresión en el adulto (Guillin et al., 2003). La falta de BDNF reduce selectivamente la expresión de los receptores D3 (Guillin et al., 2001). Esto sugiere que existe una estrecha interacción entre el BDNF y los receptores D3, ya que al activarse éstos aumentan la producción del BDNF que mediaría los efectos neurogenéticos de aquellos, dando lugar a neuronas maduras; que, en el caso de las neuronas dopaminérgicas, a su vez producen BDNF que promovería la expresión de más receptores, estableciéndose así un círculo virtuoso auto-sostenido (Reyna, 2012). Cabe señalar que las neuronas dopaminérgicas de la SNc compacta expresan RNAm para BDNF (Venero, 1994), y que la expresión de BDNF, al igual que la producción de dopamina, se ve disminuida en la SNc de pacientes con la EP (Howells, 2000).

Si el BDNF es un factor autocrino/paracrino para las neuronas dopaminérgicas de la SNc, la pérdida de neuronas que expresan BDNF puede comprometer el bienestar de sus vecinas supervivientes. Por otra parte, las neuronas que expresan niveles particularmente bajos de mRNA para BDNF pueden ser los grupos de mayor riesgo de lesiones en la EP y, posiblemente, el detonante de la propia degeneración (Howells, 2000).

En este sentido, las deficiencias de memoria asociada a la EP se han relacionado con una disminución importante en los contenidos dopaminérgicos (Lewis, 2005; Shohamy, 2005) y a medida que las lesiones progresan se pierden neuronas en el hipocampo, en la corteza entorrinal y en las áreas asociadas de la neocorteza (Segovia De Arana, 2002).

La enfermedad de Parkinson EP se considera la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, en México afecta del 1 al 2% de las personas mayores de 65 años. En consecuencia, con base en las cifras del INEGI, se calcula que podrían existir alrededor de 140,000 individuos con esta afección en México (Ramírez et al., 2006).

Es una enfermedad compleja de origen multifactorial que se debe a la interacción de factores ambientales y uno o más genes que confieren susceptibilidad. Es un trastorno neurodegenerativo, progresivo de curso prolongado, que se manifiesta en la edad adulta y que clínicamente se caracteriza por temblor rítmico involuntario, rigidez, pérdida de la expresión facial, salivación y manifestaciones psiquiátricas, particularmente del tipo de la depresión (Salamanca, 2004).

Además de las manifestaciones clínicas, citológicamente la EP se caracteriza por presentar depósitos de material proteico en el citoplasma de las neuronas que se conocen como cuerpos de Lewy, y el hallazgo más característico es una pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNc (Ramírez et al., 2007).

El tratamiento de la EP sigue siendo un problema de difícil solución. Desde que se demostró que en la EP el cuerpo estriado presenta un déficit de DA que se ve reflejado por la disminución de 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (DOPAC) y otros metabolitos de DA y noradrenalina (Hornykiewicz, 1966) se han establecido diversos tratamientos con el objeto de minimizar los síntomas de esta enfermedad y mejorar la función de las estructuras involucradas. Sin embargo hasta el momento ningún tratamiento ha demostrado de forma fehaciente la capacidad para modificar la evolución del proceso degenerativo (Segovia De Arana, 2002).

Debido a que la DA administrada de manera exógena no atraviesa la BHE, comúnmente se emplea un precursor de este neurotransmisor que es capaz de atravesarla: la L-3,4-dioxifenilalanina o L-DOPA la cual se forma a partir del aminoácido L-tirosina como uno de los pasos intermedios de la síntesis de catecolaminas. Básicamente existen 2 reacciones a partir de las cuales la L-tirosina se transforma en DA; la primera es catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH), la cual utiliza tres cofactores para realizar su función: tetrahidrobiopterina (BH4), hierro y oxígeno que actúan sobre la L-tirosina para dar paso a la formación de L-DOPA; la siguiente reacción, es catalizada por la Dopa Descarboxilasa (DDC), que utiliza piridoxal 5'fosfato (PLP) como cofactor logrando la descarboxilación de la L-DOPA para producir DA (Vallone, 2000).

La L-DOPA atraviesa la BHE y es captada por las neuronas dopaminérgicas remanentes o bien por otras neuronas aminérgicas (catecolaminérgicas o serotoninérgicas). Debido a la presencia en el plasma de enzimas que convierten a la L-DOPA a DA, el precursor se administra a la par de un inhibidor de las descarboxilasas periféricas, como las hidrazidas carbidopa y bencerazida, en particular la primera (Feldman, 1997; Richardson, 1982).

La L-DOPA administrada vía oral, que es la vía común, se absorbe en el duodeno y primeras porciones del yeyuno almacenándose en el estómago, en donde puede ser transformada a DA por acción de la DDC. La DA que circula en el plasma, luego de la acción de la DDC sobre la L-DOPA, produce múltiples y frecuentes efectos adversos, como náuseas y vómitos; posteriormente, la DA es metabolizada en el hígado, músculos, riñones y glóbulos rojos por la catecol-orto-metil-transferasa (COMT) y en el cerebro por la MAO-B, de esta manera, la biodisponibilidad cerebral se reduce a tan solo un 5%-10% (Vallone et al., 2000).

El empleo de la L-DOPA, revolucionó el tratamiento de la EP por su eficiente capacidad para reducir el temblor, la rigidez y las bradicinesias aunque como todos los fármacos tiene algunos efectos adversos, entre los más comunes se encuentran las náuseas y los dolores abdominales. Además de severas complicaciones motoras manifestadas por la disminución de la duración del efecto, y por la aparición de movimientos involuntarios también llamados discinesias (Mones et al., 1970).

Se han descrito algunas vías por las cuales, la L-DOPA puede tener efectos adversos; por ejemplo: Maharaj y colaboradores reportaron en el 2005, que la L-DOPA estimula la peroxidación lipídica *in vitro* en la presencia de hierro y de ácido ascórbico en homogeneizado de cerebro de ratón; y que la DA tiene una reacción química con el hierro y el ácido ascórbico, que provoca la inducción de formas hidroxiladas de los productos de la DA. En base a que la SNc es el principal núcleo afectado durante la EP y que en ella se han detectado altos contenidos de hierro, es posible inferir que la administración de L-DOPA produce un estado alterado en cuanto al balance oxidativo de la sustancia nigra,

por lo que se ha sugerido que la administración de un antioxidante como la melatonina podría mejorar o retardar el curso de la enfermedad (Adler y Ahlskog, 2000).

Ante la posibilidad de que el progreso de la enfermedad se vea impulsado por el desbalance oxidativo inducido por la administración de L-DOPA se ha propuesto el empleo de antioxidantes como coterapia.

Una sustancia que se ha destacado por su acción antioxidante es la Melatonina una hormona producida en la glándula pineal. La melatonina actúa como un mensajero químico de traducción de información de fotoperiodos en el cerebro, también como mediador de ritmos reproductivos, circanales, ritmo circadiano, hibernación, sueño-vigilia y temperatura (Veneck, 1998; Simonneaux, 2003; Reiter, 2003).

La melatonina protege células, tejidos y órganos del daño oxidativo, ya que neutraliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (ON), el radical superóxido (O^{2-}) y NOO^- (Reiter, 2000; Reiter et al., 2000); más aún puede inducir la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (Bondy y Sharman, 2007), disminuyen los niveles de peroxidación de lípidos (Harms, 2000; Khaldy, 2003), tiene efectos oncostáticos y estimulan el sistema inmune (Reiter, 2003; Boutin, 2005).

La administración de melatonina tiene importantes efectos positivos ya que favorece la proliferación, maduración y diferenciación neuronal, además de mejorar las capacidades cognitivas de animales de edad avanzada o que padecen determinadas neuropatologías, sin afectar a individuos jóvenes (Roig, 2015).

Datos de nuestro laboratorio han mostrado que la coadministración de L-DOPA-melatonina en animales con el modelo de EP mejoran el desempeño, (Mayoral, 2008; Torres, 2012) y preservan mayor número de neuronas dopaminérgicas a nivel de la SNc (Gutiérrez, 2007; Torres, 2012).

HIPOCAMPO

La formación hipocámpica comprende seis regiones distinguibles conectadas de forma unidireccional: el hipocampo, formado por el hipocampo propio y el giro dentado (separados por la fisura hipocámpica); el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989).

La investigación sobre el significado funcional de la neurogénesis adulta, hasta ahora, se ha centrado principalmente en el GD. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las células granulares (CG) recién diferenciadas no operan de manera aislada, sino más bien son parte de un circuito neuronal importante para el aprendizaje y la memoria que se origina en la corteza entorrinal (CE). Se considera que el flujo de información de la CE es procesado en serie por la transmisión sináptica excitatoria a la DG → CA3 → CA1 y de nuevo a la CE (Vivar y Van Praag, 2013). Si bien se ha hecho cada vez más claro que hay redes recurrentes entre estas áreas (Lisman, 1999; Scharfman, 2007) para las nuevas CG. Las neuronas recién diferenciadas reciben entrada preferencial de la corteza entorrinal lateral, perirrinal, y algunas inervaciones de corteza entorrinal central, o una "retroproyección" directa desde el área CA3. Esta conectividad única puede tener implicaciones importantes para la comprensión del papel de las nuevas neuronas del DG en función de la memoria (Vivar y Van Praag, 2013).

El GD está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas: stratum granulare (donde residen las células granulares, Gr)(Fig.1). Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgicas y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica, stratum moleculare o capa molecular (Mol) (Fig.1), se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del GD, designada hilus, se caracteriza por ser polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares (Amaral, 1978; Amaral y Witter, 1989).

Entre el stratum granulare y el hilus se puede distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Altman y Das, 1965; Kaplan y Bell, 1984; Altman y Bayer, 1990; Seri et al., 2001).

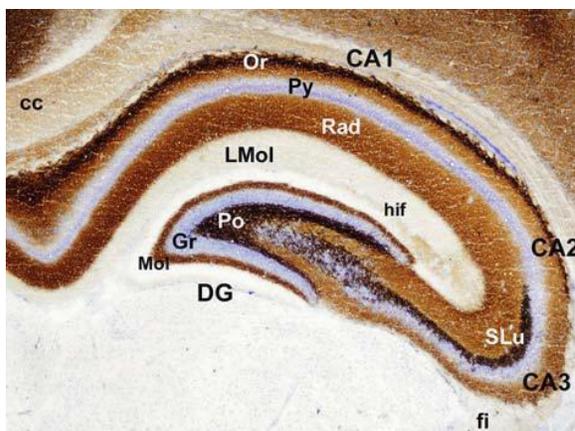


Figura 1. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: oriens (Or), piramidal (Py), radiatum (Rad) y lacunosum moleculare (LMol). Únicamente, en la área CA3, hay otra capa denominada stratum lucidum (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), se observa la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po; fi, fimbria; cc, corpus callosum). (figura extraída de Amaral y Witter, 1989).

El hipocampo está dividido en tres áreas: CA1 (Cuerno de Amón 1), CA2 (Cuerno de Amón 2) y CA3 (Cuerno de Amón 3). La zona más distal del hipocampo, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. Las distintas áreas están estratificadas (Fig.1). Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras, el alveus o sustancia blanca.

Luego, encontramos una capa estrecha, el stratum oriens (Or), formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el stratum pyramidale (Py), de naturaleza glutamatérgica. A continuación, encontramos el stratum radiatum (Rad), formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica) encontramos el stratum lacunosum moleculare (LMol), que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre el stratum pyramidale y el radiatum, se localiza un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del GD, el stratum lucidum (SLu) (Fig.1)(Amaral y Witter, 1989).

La formación hipocámpica posee un circuito trisináptico excitador que se inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal, cuyas proyecciones contactan con las células granulares del GD. Estas envían sus axones (fibras musgosas) hacia las neuronas piramidales de la CA3, atravesando el hilus (Amaral, 1978; Chicurel y Harris, 1992) y éstas a su vez envían sus axones hacia las neuronas piramidales de el área CA1, mediante las colaterales de Schaffer (SC), como puede observarse en la Fig.2.

La principal conexión externa de la formación hipocámpica se establece con el septum. Las células granulares del GD no proyectan hacia afuera de la formación hipocámpica, sin embargo reciben axones provenientes del hipotálamo (Swanson y Cowan, 1977; Vertes, 1992) (Fig.2). Las neuronas de el área CA3 envían sus axones fuera de la formación hipocámpica únicamente a la región septal (Amaral y Witter, 1989). Por el contrario, las neuronas del área CA1 proyectan hacia la región septal, pero también hacia la corteza frontal, retrosplenial y perirrinal, así como hacia el bulbo olfatorio, la amígdala y el hipotálamo (Jay et al., 1989; Groen y Wyss, 1990).

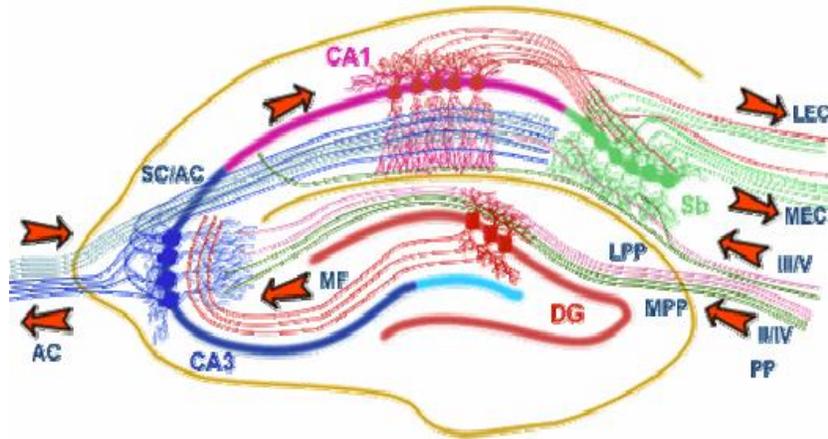


Figura 2 .Conexiones del Hipocampo (en roedor). El hipocampo tiene una red de conexiones principalmente unidireccional, con una conexión de entrada desde la corteza Entorrinal (EC) que conecta con el Giro Dentado (GD) y hacia CA3 por la vía perforante (PP). Las neuronas piramidales del área CA3 reciben la conexión del GD por la vía de las Fibras Musgosas (MF). Ellas a su vez emiten sus axones a las células del área CA1 por la vía Colateral de Schaffer, del mismo modo que las células de la área CA1 emiten hacia el hipocampo contralateral por la vía Comisural Asociativa. Las células piramidales de la área CA1 reciben una conexión directa por la vía Perforante y mandan sus axones al Subiculum (Sb). Estas neuronas devuelven la información hipocámpica de nuevo a la EC, cerrando de esta forma el ciclo de información (Figura tomada de MRC "Centre for Synaptic Plasticity, School of Medical Sciences, Department of Anatomy, University Walk, Bristol").

Estudios relacionados con las proyecciones axonales de las células granulares hacia el área CA3, las fibras musgosas, muestran un orden topográfico en estas proyecciones, es decir, las eferencias de las proyecciones axonales de las células granulares está dirigida a una localización concreta del área CA3 (Hastings et al., 2001). Sin embargo, las neuronas granulares laterales y superficiales, habiendo sido éstas formadas durante etapas tempranas en el desarrollo, envían proyecciones más divergentes al área CA3 que las proyecciones emitidas por las neuronas formadas durante etapas más tardías del desarrollo. Aunque la competición sináptica se cree que juega un papel determinante en la divergencia de la emisión de las fibras musgosas (Blackstad et al., 1970; Gaarskjaer, 1978), los mecanismos topográficos que determinan esta divergencia, así como su explicación funcional, permanecen desconocidas. De este modo, se propone que cada región concreta de la capa granular del GD podría estar destinada a una función hipocámpica concreta, y por tanto, emitiría su proyección axonal a una localización específica de la área CA3 (Hastings et al., 2001).

En el GD, la población de células precursoras reside en la capa ZSG (zona subgranular). La progenie de estas células en continua división migra distancias cortas hasta la capa granular. Una vez situadas en esta capa, estas células emiten las dendritas hacia la capa molecular, hasta contactar con las células granulares allí presentes con anterioridad, además de emitir su axón a lo largo de las fibras musgosas que van a contactar con la región CA3 del hipocampo. Después de un corto plazo de tiempo, éstas células están completamente integradas y son funcionales, por lo que no podrán diferenciarse de las que residían en esa zona con anterioridad (Rao y Shetty, 2004).

De este modo, en el GD, aparecen los siguientes tipos celulares:

- Las células tipo B (astrocitos): denominadas como las células madre neuronales y con capacidad de autorenovarse. Su morfología es parecida a la de las células de la glía radial, poseen un soma triangular con un proceso apical que alcanza la capa de células granulares (Seri et al., 2001). Pueden diferenciarse dos tipos de astrocitos basados en su orientación en la ZSG:

- Astrocitos radiales (rAs): poseen un cuerpo celular grande, con forma redondeada, poligonal o triangular, con una fina lámina basal orientada tangencialmente a lo largo de la ZSG y una prolongación radial que crece profundamente en la capa molecular. Este tipo de astrocitos poseen más orgánulos, poliribosomas y mitocondrias que el otro subtipo astrocítico (Seri et al., 2004).

- Astrocitos horizontales (hAs): no poseen proyección radial pero extienden su arborización en paralelo a la capa ZSG y unas ramificaciones secundarias hacia el hilus y la capa granular. Su cuerpo celular es alargado (Seri et al., 2004).

Ambos subtipos astrocíticos son positivos para el marcador de astrocitos maduros GFAP, para el marcador de astrocitos inmaduros vimentina, y para la proteína musashi que se une al RNA específico de astrocitos (Sakakibara y Okano, 1997).

- Las células tipo D: son las precursoras intermediarias en la formación de las nuevas neuronas granulares, y provienen de la división de las células As. Las células D aparecen, generalmente, formando grupos de dos a cuatro células del mismo tipo. Pueden diferenciarse tres subtipos de células D según su ultraestructura y morfología:

- Células D1: son células pequeñas con forma redondeada, ovoide o de gota invertida. Generalmente no tienen prolongaciones en el plano de la ZSG.

- Células D2: poseen una prolongación corta, a veces bifurcada. Se diferencian tres clases de células tipo D2 según la orientación de su proyección respecto a la capa granular: las células D2v, con su proyección orientada verticalmente, las de tipo D2h, cuya proyección es horizontal, es decir, paralela a la capa granular, y por último, las células D2i, con la prolongación invertida respecto a la capa granular, apuntando hacia el hilus.

- Células D3: poseen una arborización prominente, con una prolongación radial que se extiende a través de GCL hacia la capa molecular (ML), y unas finas proyecciones hacia el hilus. Estas células, renombradas por algunos autores como células progenitoras neuronales amplificadoras (Encinas et al., 2006; Balu et al., 2008).

- Células G (Neuronas Granulares): estas nuevas neuronas se sitúan en el borde entre ZSG-GCL. Su soma es redondeado, con una arborización dendrítica que se extiende hacia la capa molecular y su axón se prolonga hasta hacer sinapsis con las células de la región CA3 del Cuerno de Amón, características de las neuronas maduras, por tanto raramente se dividen (Kronenberg et al., 2003); eléctricamente activas y capaces de descargar potenciales de acción en respuesta a descargas sinápticas, y de recibir descargas sinápticas tanto inhibitorias como excitatorias. Además son capaces de liberar neurotransmisor en respuesta a los potenciales de acción (Song et al., 2002).

La innervación dopaminérgica hacia el hipocampo se originan en los grupos de células dopaminérgicas del área ventral tegmental (A10) y la SNc (A9) ver figura 3. Las aferentes dopaminérgicas llegan a la región del hipocampo principalmente a través de la ruta dorsal (Scatton, 1980). Por esta razón la degeneración de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo durante la EP puede afectar a regiones remotas del cerebro que están inervadas por las proyecciones de estas neuronas. El GD, el sitio de producción continua de nuevas neuronas en el hipocampo adulto, recibe entradas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

La marcada caída de los niveles de DOPAC en el hipocampo después de la transección de la fimbria-fórnix sugiere que las aferentes dopaminérgicas a la formación hipocámpica entran principalmente a través de la ruta dorsal (Lindvall y Bjorklund, 1978; Simon et al., 1976).

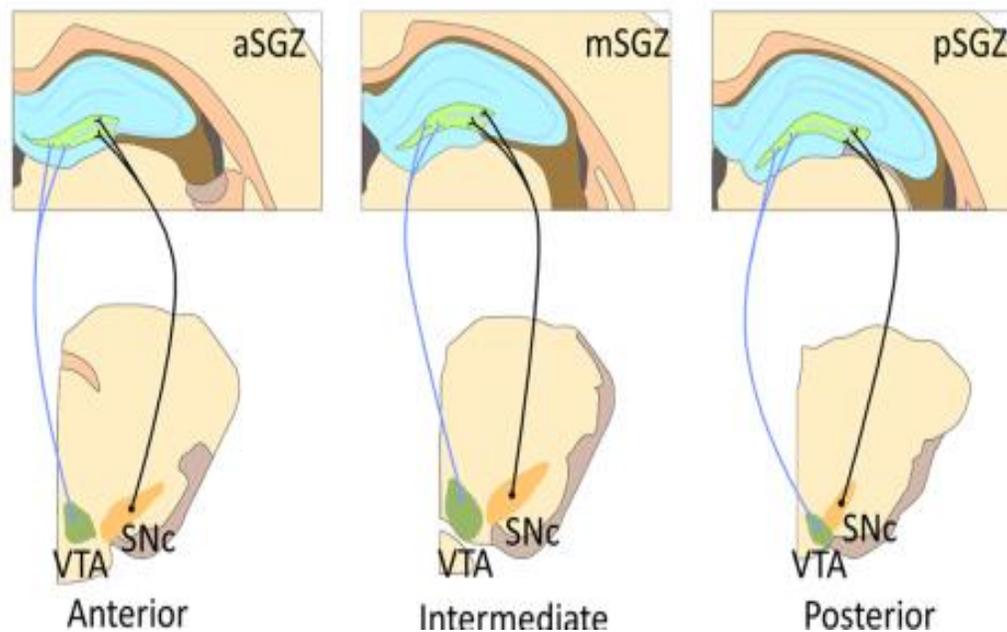


Fig 3. Topografía de la innervación dopaminérgica de la SNc y AVT a la ZSG. Células dopaminérgicas localizadas en el área tegmental ventral (AVT) y SNc inervan conjuntamente la ZSG en el hipocampo anterior, y porciones posteriores intermedias (aZSG, mZSG, pZSG, respectivamente) (Höglinger et al., 2014).

Durante la primera mitad del siglo se pensó que la formación hipocámpica estaba relacionada primariamente con el olfato, razón por la que se llamó Rinencéfalo o cerebro olfatorio. Pocas evidencias apoyaron este punto de vista ya que animales anósmicos podían tener un desarrollo del hipocampo normal. Papez (1937) propuso que la formación hipocámpica y sus conexiones con los cuerpos mamilares, núcleos talámicos y corteza cingular, constituían un circuito neural responsable de las experiencias emocionales y la respuesta a las mismas (Teoría de Papez). Después se interpretó que el papel modulador en la experiencia emocional estaba más relacionado con el complejo amigdaloides que con la formación hipocámpica.

Hoy se acepta ampliamente que la función del hipocampo está relacionada con la memoria (Scoville y Milner, 1957; Zola-Morganand y Squire, 1991; Bizon et al., 2003; Winters, 2004). Además se ha demostrado la relación entre neurodegeneración de poblaciones hipocámpicas y la enfermedad de Alzheimer, así como algunos tipos de amnesia (Takeda et al., 2007). Por otra parte se ha demostrado el papel del hipocampo en la memoria en base a la potenciación de largo plazo (LTP) y la plasticidad sináptica en la mayoría de los componentes del circuito hipocámpica (Izquierdo y Medina, 1995; Adams, 2004).

Son clásicos los experimentos en que la eliminación de ambos hipocampos, para inhibir crisis epilépticas, originó una pérdida de la memoria a corto plazo (Scoville y Milner, 1957). Estas observaciones, y otros estudios en animales (Wu, 2000; Parent y Baxter, 2004), confirmaron el papel del hipocampo en la memoria.

Se sabe que el hipocampo, especialmente las áreas CA1 y CA3, participa en la denominada "memoria espacial". O'Keefe (1978) y Muller (1996) demostraron la existencia de células piramidales hipocámpicas denominadas "*Place cells*", las cuales se cree que dan información del lugar específico en donde se encuentra el sujeto. Experimentos posteriores han determinado que estas células se activan cuando la cabeza del animal está orientada en determinada posición (Frielingsdorf et al., 2006). Otras investigaciones han demostrado que el hipocampo también participa en otros tipos de memoria (Dussek et al., 1997).

NEUROGÉNESIS

Uno de los dogmas fundamentales mantenido en las neurociencias hasta el siglo pasado sostenía que la regeneración del sistema nervioso no puede ocurrir en etapas de la vida adulta. Sin embargo, a partir de los trabajos de Joseph Altman en la década de los 60s, utilizando la técnica de autoradiografía con timidina tritiada (timidina-3H) para marcar células en división, se demostró la existencia de neurogénesis en algunas áreas del cerebro postnatal y adulto de la rata. Específicamente en el bulbo olfatorio (BO) y elGD del hipocampo (Altman et al., 1965). Estas observaciones recibieron poca atención durante los años siguientes, hasta que en la década de los 90s diversos grupos reforzaron las investigaciones con las que se demostró que la neurogénesis persiste en los mamíferos, incluido el humano (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999).

El descubrimiento de que nuevas neuronas continúan generándose en el cerebro adulto ha modificado el concepto de plasticidad cerebral y ha revelado nuevos mecanismos que garantizan la homeostasis del sistema nervioso. La neurogénesis, es un proceso que involucra la generación de nuevas neuronas, se ha demostrado en el hipocampo y en el bulbo olfatorio de mamíferos adultos. Los precursores primarios se han identificado en zonas especializadas denominadas nichos neurogénicos. De forma interesante, la célula que da origen a las nuevas neuronas en el cerebro adulto expresa marcadores de células gliales, un linaje celular diferente al de las neuronas. Trabajos realizados durante el desarrollo del cerebro, han demostrado que la glía radial no solo se diferencia en astrocitos, también neuronas, oligodendrocitos y células ependimales. Además, se ha reportado que la glía radial es también la precursora de las células troncales/progenitoras neuronales del cerebro adulto. En conjunto, estos datos soportan la idea de que las células troncales/progenitoras se desarrollan de un linaje neuroepitelial-glía radial-astrocítico. Es así que la identificación de los precursores primarios, tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto, es fundamental para comprender el funcionamiento del sistema nervioso y posiblemente desarrollar estrategias de reemplazo neuronal en diversos procesos neurodegenerativos (Langston et al., 1987).

En el proceso de neurogénesis se diferencian varias etapas: la primera es la proliferación celular a partir de células progenitoras (citogénesis), en segundo lugar ocurre la diferenciación o maduración a neuronas, proceso que puede ocurrir de forma paralela a su migración, y por último, su integración funcional en circuitos neuronales. La neurogénesis implica proliferación y diferenciación, que se traduce en la re-entrada y salida de neuroblastos en el ciclo celular. En este sentido, existe un incremento en el número de neuroblastos que salen del ciclo celular y se diferencian durante el desarrollo (Caviness et al., 2000). La diferenciación neuronal es un proceso clave, estrechamente vinculada con el ciclo celular, ya que las células que salen de éste en fases tempranas, exhiben unas determinadas características, mientras que las que salen en las fases tardías exhiben otras (Ohnuma y Harris, 2003). Por ello, debe existir una precisa coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neuronal.

La diferenciación neural ocurre simultáneamente con la migración celular. Las células postmitóticas en migración, empiezan a desarrollar proyecciones que se extienden hacia las regiones donde establecerán su posición final (Auladell et al., 1995). Las nuevas neuronas, una vez posicionadas en la capa granular, emiten su proyección axonal a lo largo de las fibras musgosas para conectar con las células piramidales de la zona CA3, aproximadamente después de 4 y 10 días de su división (Hastings y Gould, 1999). Las dendritas de estas nuevas neuronas crecen en la dirección opuesta a los axones, emitiéndose a la capa molecular tras dos semanas, y permanecen creciendo durante meses (Van Praag et al., 2002).

Los mecanismos de diferenciación y crecimiento axonal no están aún bien dilucidados, ya que en los mecanismos de diferenciación pueden estar implicadas una gran cantidad de proteínas diferentes. Algunos estudios muestran que la supervivencia de las nuevas células, está regulada por la actividad de su propio receptor de glutamato tipo NMDA (N-metil-Daspartato) durante un periodo corto tras su formación (Tashiro et al., 2006), sugiriendo que la supervivencia de las nuevas neuronas y su posterior integración están reguladas por señales internas.

De hecho, en la diferenciación neuronal se ha descrito que los neuropéptidos (somatostatina, colecistoquinina, VIP o la sustancia P), los componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina y colágeno), los factores tróficos (NGF, EGF, FGF, IGF, BDNF), los neurotransmisores (serotonina, dopamina acetilcolina) y las interacciones con las células gliales, pueden estar estrechamente vinculados con los fenómenos de elongación axónica, migración celular e interconexión celular (Vernadakis y Mangoura, 1988; Ivins y Pittman, 1989; Hatten y Mason, 1990).

Durante la diferenciación en el hipocampo, las células de amplificación transitoria se convierten en neuronas inmaduras. Posteriormente, éstas extienden sus proyecciones axonales a lo largo de las fibras musgosas hacia la capa CA3, y envían sus dendritas en la dirección opuesta hacia la capa molecular (Ming y Song, 2005).

Cuando se produce la integración funcional, las nuevas neuronas granulares reciben señales de entrada desde la corteza entorrinal, y las envían a el área CA3 y al hilus (Ming y Song, 2005). Figura 4.

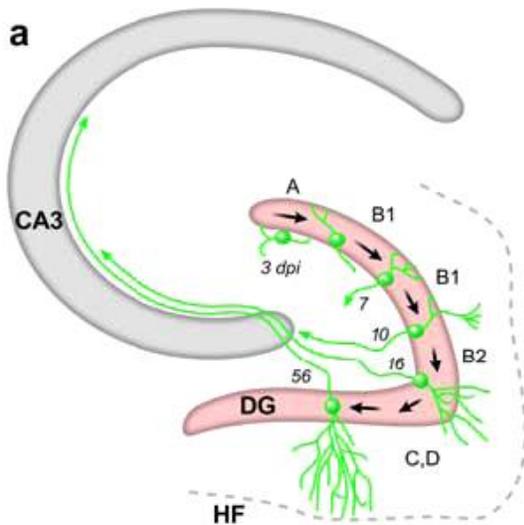


Figura 4. Estadios del crecimiento dendrítico en el hipocampo. Se muestra el desarrollo del axón y el crecimiento dendrítico, siguiendo una clasificación temporal, definida por los autores basada en las observaciones hechas a partir del marcador DCX. Etapa A (0-3 días): polarización, migración y crecimiento axonal y dendrítico; Etapa B1 (3-11 días): crecimiento axonal y dendrítico principalmente; Etapa B2 (12-16 días): entrada de los axones a CA3; Etapa C (a partir del día 16): crecimiento de las espinas; Etapa D (a partir del día 56): modificación estructural de las espinas. (Las flechas a lo largo del GD, indican desplazamiento temporal y no espacial) (Imagen de Zhao et al., 2006).

Aunque no está bien caracterizado, es posible trazar el proceso de maduración de las células recién formadas en el GD, mediante la expresión diferencial de marcadores moleculares. De esta manera, la β -tubulina-III, marcará un estadio posterior de maduración al observado en las células que expresan DCX, o el marcador típico de neuronas completamente maduras como es el NeuN, que junto con los marcadores de proliferación nos permitirán caracterizar la población celular existente, diferenciando entre células en proliferación, las que estén en maduración y aquellas que ya han madurado.

Del mismo modo se podrán diferenciar las neuronas de las células de la glia donde estos marcadores no se expresan (Zhao et al., 2006).

El BrdU (5'-bromo-2-deoxiuridina) es un marcador exógeno que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA mientras la célula se está dividiendo. Uno de los problemas que muestra este tipo de marcadores exógenos, es que deben ser inyectados en el animal, y esto puede alterar la división o la diferenciación de las células a estudiar, e incluso, con el uso de drogas la barrera hematoencefálica puede verse alterada y por tanto, la cantidad de dosis que llegaría a las células estaría modificada (Cameron y McKay, 2001; Kee et al., 2002). La sensibilidad del BrdU depende de la dosis inyectada y de la técnica inmunohistoquímica para detectar el anticuerpo (Cameron y McKay, 2001).

El marcador más utilizado para identificar neuronas es el NeuN, que se restringe a neuronas postmitóticas (Fig. 4). Pero unas pocas células de la población neuronal que incluye las células de Purkinje cerebelosas, las células mitrales del BO y una población de neuronas en el núcleo coclear, son negativas para NeuN. El nombre del marcador NeuN proviene de "neuronal nuclei", es decir, núcleo neuronal, puesto que la expresión se localiza principalmente en el núcleo, aunque ocasionalmente también marca la zona cercana a éste y algunas neuritas. Se ha observado que el NeuN puede unirse al ADN, lo que sugiere que se trata de un factor de transcripción que se activa cuando ha terminado la diferenciación (Mullen et al., 1992).

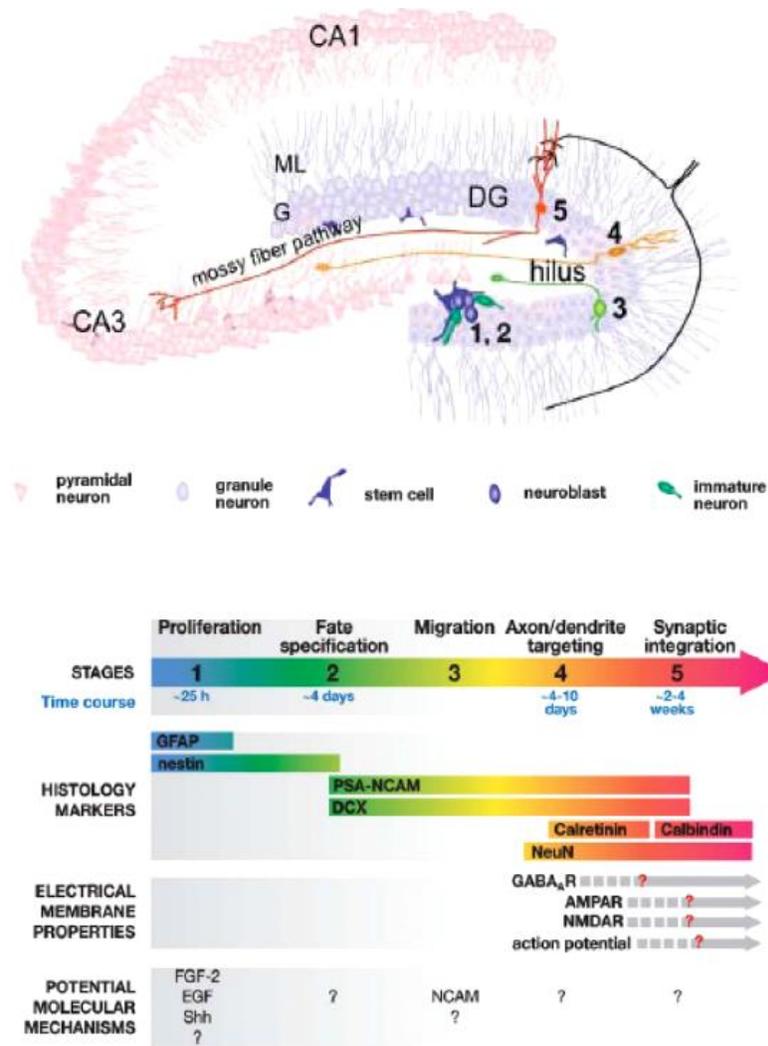


Figura 5. Fases de la neurogénesis y marcadores. Se muestran las fases que siguen las células presentes en el hipocampo durante la neurogénesis. En la fase 1- proliferación: las células madre (de color azul) con sus cuerpos celulares situados en la capa subgranular del giro dentado emiten sus procesos radiales hacia la capa granular y sus cortos procesos tangenciales se extienden hacia la capa granular y el hilus. Estas células dan lugar a las células amplificadoras transitorias (verde intenso). En la fase 2- diferenciación: paso en el cual las células amplificadoras se diferencian a neuronas inmaduras (verdes). En la fase 3- migración: las células inmaduras migran una corta distancia hacia la capa granular. En la fase 4- emisión del axón y las dendritas: las neuronas inmaduras (naranja) extienden sus proyecciones axonales hacia la vía de las fibras musgosas a las células piramidales de la zona CA3. Además emiten sus dendritas en dirección opuesta, hacia la capa molecular. Por último, en la fase 5-: Integración sináptica: las nuevas neuronas granulares (rojas) reciben señales de entrada de la corteza entorrinal y mandan señales de salida hacia las zonas del CA3 y el hilus. Las características específicas de cada fase se resumen en la parte inferior de la figura. Tanto los marcadores histológicos, como las propiedades eléctricas de las membranas en cada fase e incluso los mecanismos moleculares que se potencian en cada etapa. GD: región del giro dentado, ML: capa molecular; GL: capa granular (Imagen tomada de Ming y Song, 2005).

La neurogénesis adulta es un proceso extremadamente dinámico, que puede ser regulado tanto por factores intrínsecos como extrínsecos que afectan a la proliferación, supervivencia, maduración e integración funcional de las neuronas (Figura 5)(Duman et al., 2001).

La neurogénesis no es un proceso biológico estático, ya que su tasa es variable y es altamente dependiente de los cambios del entorno neuroquímico y ambiental (Peterson, 2002). Estudios recientes han demostrado que la actividad física, los ambientes enriquecidos, la restricción calórica y la modulación de la actividad neural, así como los factores hormonales, los esteroides ováricos y los estrógenos endógenos, actúan como reguladores positivos de la neurogénesis (VanPraag et al., 1999; Banasr et al., 2001; Mirescu y Gould, 2004; Tanapat et al., 2005). Por el contrario, los animales que viven en condiciones de estrés o de aislamiento, presentan una baja tasa de neurogénesis en el giro dentado, incluso una profunda inhibición (Gould et al., 1997; Tanapat et al., 2001).

La generación de células madre y la diferenciación de las células precursoras son procesos regulados por el microambiente o nicho específico, en el que estas células residen (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

A continuación se detallan algunos de los factores que pueden alterar la neurogénesis, únicamente se explican aquellos que se consideran relevantes en la regulación de la neurogénesis.

CONDICIONES DE ESTRÉS

Se han encontrado efectos contradictorios en cuanto a la regulación de la neurogénesis hipocámpica mediada por estrés, en los que la exposición puntual a estrés produce la disminución en la proliferación celular total (Gould et al., 1998), en cambio la exposición más prolongada a bajos niveles de estrés, produce efectos positivos en la neurogénesis (Gould et al., 1997), por último, altos niveles de estrés causan una baja tasa de neurogénesis en el GD o, incluso una inhibición total (Tanapat et al., 2001). Por tanto, la relación entre la exposición al estrés y los niveles de neurogénesis seguiría una pauta de U invertida.

Alteraciones en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, inducidas por situaciones persistentes de estrés durante el desarrollo, pueden conducir a una bajada permanente en la producción de nuevas células en el GD (Lemaire et al., 2000). Además, la proliferación celular en el GD es disminuida por los glucocorticoides, los cuáles son liberados en respuesta al estrés (Tanapat et al., 2001).

GLUTAMATO

La vía de señalización a través de glutamato es activada a través de tres tipos de receptores ionotrópicos: el receptor de NMDA, el receptor de ácido kaínico (KA) y el receptor AMPA (α -amino-3-hidroxi-5- metilisoxazolpropionato) (Balu et al., 2008).

Tras destruir la vía perforante (principal aferencia glutamatérgica al GD), se observa un aumento de la proliferación, por lo que se deduce que el glutamato produce la inhibición de la división celular bajo éstas condiciones, mediado por la activación de receptores de NMDA (Bursztajn et al., 2007).

Sin embargo, también se han identificado situaciones bajo las que el glutamato produce un aumento de la proliferación, mediado por la activación de los receptores AMPA (Bai et al., 2003). Del mismo modo, la estimulación de los receptores KA produce un aumento en la neurogénesis hipocámpica (Parent et al., 1997; Jessberger et al., 2007).

DOPAMINA

Las fibras dopaminérgicas procedentes del AVT inervan la ZSG. La destrucción selectiva de estas fibras provoca un descenso de la proliferación celular, que se correlaciona con una disminución de células marcadas con PCNA en la capa ZSG (Höglinger et al., 2004).

Otros estudios que nos permiten esclarecer cómo la DA contribuye a la regulación de la neurogénesis son aquellos en los que se administran agonistas o antagonistas de los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos. Así pues, tras la administración de un antagonista del receptor D2 no se observa ningún efecto sobre la proliferación (Malbreg et al., 2000). Y la administración de un agonista del receptor D3 aumenta la neurogenesis en la ZSV y el estriado, así como en la sustancia nigra (Van Kampen y Robertson, 2004), pero hasta el momento no se ha probado que este receptor participe en la regulación de la neurogénesis en el hipocampo.

SEROTONINA

Los terminales serotoninérgicas provenientes de la zona dorsal y medial del núcleo del rafe inervan a diversas estructuras cerebrales, entre ellas el hilus, la capa molecular y la capa ZSG del giro dentado del hipocampo (Oleskevich et al., 1991). Algunas investigaciones demuestran que la serotonina produce un aumento de la proliferación en el GD y la ZSV adultos, de este modo si se inhibe la síntesis de 5-HT (serotonina) mediante el inhibidor paraclorofenilalanina (PCPA) (Banasr et al., 2001), o lesionando de manera selectiva las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (Brezun y Daszuta, 1999), se produce una disminución de células BrdU+ y PSA-NCAM en el GD y la ZSV, por lo tanto, disminuyen las células inmaduras del hipocampo .

En la regulación de serotonina pueden participar 15 receptores de serotonina, aunque los mecanismos concretos siguen sin estar del todo dilucidados. De este modo, se sabe que la activación del receptor 5-HT_{1A}, afecta a la neurogénesis en la zona del GD mediante mecanismos indirectos (Sahay y Hen, 2007). También se ha demostrado que la administración de un antagonista del receptor 5-HT_{2A}, produce la disminución de la proliferación de las células hipocámpicas (Banar et al., 2004). En cambio el receptor 5-HT₄ aumenta la proliferación celular en el hipocampo de las ratas tratadas con su agonista (Lucas et al., 2007). El papel de la serotonina en la regulación neurogénica es complejo, no sólo depende del subtipo de receptor expresado, sino que además participa el estado del organismo, puesto que la serotonina puede inducir factores tróficos y neurotrofinas que a su vez afectan a la regulación neurogénica (Duman y Monteggia, 2006).

GABA (ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO)

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, es común que las proyecciones GABAérgicas sean una red local de interneuronas inhibitorias. El GD posee diferentes clases de interneuronas (Freund y Buzsaki, 1996), que modulan la actividad de las células granulares y controlan el nivel de GABA en el ambiente de la ZSG (Ge et al., 2006). Algunos estudios muestran que la administración de GABA produce un aumento de la expresión del factor de transcripción NeuroD, que facilita la diferenciación neuronal (Tozuka et al., 2005). En cambio, otro estudio muestra que la inactivación parcial del receptor GABA produce la reducción en la supervivencia celular, aunque la proliferación no se ve afectada. El mecanismo mediante el cual este neurotransmisor regula la proliferación, diferenciación o supervivencia del hipocampo sigue sin esclarecerse. Existen algunas evidencias que muestran que la activación de GABA es necesaria para la integración sináptica de las células granulares en el hipocampo (Ge et al., 2006).

FACTORES TRÓFICOS

Los factores de crecimiento o tróficos (BDNF, FGF, EGF, CNTF, IGF,...), implicados en guiar el destino celular, pueden determinar el tamaño de una población neuronal o glial (Kuhn et al., 1997; Pencea et al., 2001).

Asimismo, estos factores se encuentran sobre-expresados en distintos modelos neurodegenerativos, en los cuales pueden actuar como factores protectores del daño neural, pero también como factores inductores de la generación y diferenciación de nuevas células que reemplazarían las células lesionadas (Kuhn et al., 1997; Aberg et al., 2000; Pencea et al., 2001). Por tanto, en la secuencia de una lesión o daño neural, se activa la señalización para la neurogénesis, en el sentido de minimizar el daño ocasionado (Kozorovitskiy y Gould, 2003).

NEUROGÉNESIS, HIPOCAMPO Y MEMORIA

Existen diferentes sistemas de memoria:

1. Aprendizaje flexible y declarativo de estímulos, dependiente del lóbulo temporal medial.
2. Aprendizaje de hábitos o aprendizaje estímulo-respuesta y depende sobre todo del estriado.
3. Memoria emocional y aprendizaje estímulo-refuerzo, el cual se centra principalmente en la amígdala.
4. El hipocampo, el estriado y la amígdala parecen ser las estructuras más importantes para cada tipo de memoria, si bien forman parte de sistemas más amplios formados por más estructuras (Tabla 1).

Tabla 1. Principales sistemas de memoria. En la tabla se muestra una clasificación de los tipos de memorias, junto con sus principales características y estructuras asociadas a las mismas (Santín et al., 2000).

Memoria declarativa	Memoria procedimental	Memoria emocional
Episódica semántica	y Reforzada	Condicionada
Recuerdo persistente	Selección de respuesta	de Preferencias y aversiones
Expresión flexible		
Hipocampo región parahipocámpica	y Estriado, cerebelo, tronco del encéfalo y médula espinal	Amígdala, Hipotálamo, sistema nervioso autónomo y endocrino.

La participación del hipocampo en la formación de la memoria ha sido ampliamente reconocida (O'Keefe y Nadel, 1978), y numerosas evidencias sugieren que la producción de neuronas nacidas durante la etapa adulta del animal puede contribuir en los procesos de memoria. En primer lugar, el nivel de neurogénesis está directamente relacionado con el aprendizaje de tareas dependientes de hipocampo (Drapeau et al., 2003). En segundo lugar, las condiciones del aumento de la memoria producen un incremento en la neurogénesis, mientras que condiciones de disminución de la neurogénesis perjudican el aprendizaje (Kempermann et al., 1997; VanPraag et al., 1999).

Se ha demostrado que el aprendizaje espacial aumenta tanto la supervivencia de las nuevas neuronas (Gould et al., 1999) como la proliferación celular (Shors et al., 2001; Döbrössy et al., 2003). Por el contrario, se ha demostrado que el aprendizaje espacial en

un laberinto acuático está relacionado con una disminución en el número de nuevas neuronas en el GD (Döbrössy et al., 2003; Ambrogini et al., 2004). Aún más sorprendente resulta el hecho de que la disminución en la neurogénesis se vea correlacionada con las habilidades espaciales, de modo que, ratas con un bajo número de nuevas neuronas tengan mejores rendimientos en tareas de memoria, hecho que indica que el aprendizaje, y no el entrenamiento, disminuye el número de nuevas células adultas.

Este complejo entramado de resultados crea un rompecabezas en el que aumentos y disminuciones en el número de nuevas neuronas están relacionados con el aprendizaje, mediante un mecanismo todavía desconocido.

Existen pruebas, tanto a favor como en contra, de la existencia de una relación directa entre la neurogénesis y la memoria. Algunas pruebas a favor, son los estudios que relacionan numerosas drogas con la disminución de la neurogénesis, como el caso del alcohol, la nicotina y los opiáceos (Eisch et al., 2000, Abrous et al., 2002, Nixon and Crews, 2002), y todas ellas, administradas en las dosis adecuadas, pueden llegar a producir déficits en las tareas de aprendizaje (Spain y Newsom, 1991; Matthews y Silvers, 2004; Scerri et al., 2005). También confirman la hipótesis de la relación entre la neurogénesis y la memoria, los estudios relacionados con cambios complejos en el ambiente, como el aumento que se produce en el número de neuronas inmaduras tras el aumento de estrógeno en el medio (Tanapat et al., 1999), o el ejercicio físico (vanPraag et al., 1999), pueden causar un aumento en las tareas de aprendizaje dependientes de hipocampo (Daniel et al., 1994; Kempermann et al., 1997; Luine et al., 1998; vanPraag et al., 1999; Leuner et al., 2004).

Algunas de las pruebas en contra de establecer una relación entre la neurogénesis y la memoria, son los estudios en los que tras un aumento de glucocorticoides, del estrés o de la edad puede producir una disminución de la proliferación celular, que pueda resultar o no en déficits en tareas dependientes del hipocampo (Bizon and Gallagher, 2003). De hecho, la exposición al estrés puede aumentar el aprendizaje de las tareas hipocámpicas (Wood et al., 2001; Leuner et al., 2004), por lo que se establece una relación inversa entre el aprendizaje y la neurogénesis.

Una de las pruebas más claras acerca de la conexión directa entre el nacimiento de nuevas neuronas y la capacidad de memoria en mamíferos, fue el estudio realizado por Shors y su equipo en 2001, en los que se bloqueó la neurogénesis en el hipocampo de ratas (Shors et al., 2001). Para ello, administraron a los animales el metilazoximetanol (MAM), una sustancia que resulta tóxica para las células en proliferación. Con este estudio pudieron concluir que, la incorporación de nuevas neuronas al hipocampo y la renovación de circuitos neuronales en dicha zona son necesarias para el desarrollo de determinados tipos de memoria, en concreto los que implican el recuerdo del orden en que se producen determinados acontecimientos.

De este modo, los resultados confirmaron que neurogénesis y memoria están relacionadas en el cerebro de mamíferos. Y se observó que las nuevas neuronas que van

siendo incorporadas al hipocampo, podrían contribuir a procesos de formación de memoria en los que hay implicados elementos temporales (Shors et al., 2001).

La plasticidad de los circuitos hipocámpicos, es esencial para el desarrollo de su función en el aprendizaje y la memoria, pudiendo aumentar su vulnerabilidad por varios estímulos, incluyendo el estrés (McEwen, 1999). En el caso de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo, sus conexiones tanto aferentes como eferentes, son las que permiten la supervivencia de estas células debido a los estímulos que se generan durante el aprendizaje (Dupret et al., 2005). De hecho, el aumento de la actividad sináptica produce a su vez, un aumento en la supervivencia celular (Bruehl-Jungerman et al., 2006). Por el contrario, se produce una muerte de las neuronas inmaduras, de manera selectiva, de aquellas que no hayan establecido las conexiones adecuadas durante el aprendizaje. La supresión de este tipo celular, permite la integración de las neuronas con mayor estadio de maduración que se han establecido por estímulos dependientes de la actividad generada durante el curso del aprendizaje.

ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por James Parkinson en 1817, es uno de los trastornos neurodegenerativos más frecuentes y mejor estudiados. Clínicamente se caracteriza por escasez y lentitud de movimientos (bradicinesia), aumento del tono muscular (rigidez), rostro inexpresivo y un temblor característico (4 o 5 Hz por segundo) en reposo. También destaca, la marcha festinante (pasos cortos y arrastrando los pies), así como una postura flexionada y con equilibrio inestable (Langston et al., 1987).

Los defectos en la función motora se deben a la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc), una población de neuronas en el mesencéfalo que proyectan hacia su blanco principalmente el núcleo caudado y putamen, por lo que su muerte representa un déficit de DA en estas estructuras (Hornykiewicz, 2001).

En el análisis histológico postmortem en tejido de enfermos se han detectado algunas neuronas sobrevivientes, con inclusiones citoplasmáticas eosinófilas llamadas cuerpos de Lewy, formados por ubiquitina y alfa-sinucleína (Fahn, 2003).

Los síntomas de la enfermedad aparecen cuando la pérdida de las neuronas dopaminérgicas excede el umbral crítico: 70-80% menos de las concentraciones de dopamina en el estriado y 50-60% del pericarion en la SNc. Una vez que aparecen los primeros síntomas, la muerte neuronal continua y los trastornos motores progresan lentamente. Así mismo diversos mecanismos compensatorios, retrasan la aparición de los síntomas (Hornykiewicz, 2001).

La degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, es un problema fundamental en la EP. Esta degeneración se extiende a varios núcleos del tallo cerebral y otras áreas del cerebro donde hay células dopaminérgicas. Además, del déficit de DA en el estriado, se presentan alteraciones en otros neurotransmisores como: noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina y ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Hornykiewicz, 2001).

Actualmente, se desconocen las causas que generan la EP. Sin embargo, se postula que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, toxinas exógenas, acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad y deficiencias en el sistema inmune, pueden ser factores que favorecen la aparición de la EP (Langston et al., 1987; Hornykiewicz, 2001).

Los primeros esfuerzos en el tratamiento de la EP se redujeron a la ayuda sintomática y en algunos casos aislados, a procedimientos estereotáxicos ablativos que interrumpen la desinhibición resultante del eje globo pálido-tálamo-corteza hacia las neuronas motoras (Lozano et al., 1998).

A mediados de los años 50s, Arvid Carlsson demostró que el 80% de la DA del cerebro se encuentra en los ganglios basales (Carlsson, 1959). Más tarde, Olen Hornykiewicz descubrió que el cerebro de los pacientes con EP tenía un déficit de DA en el estriado, sobre todo en el putamen. A principios de los años 60s se demostró que la EP se debe a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Con base en estos conocimientos, Walter Brittmayer y Olen Hornykiewicz reportaron que con la administración intravenosa de L-dihidroxitifenilalanina (L-DOPA), la molécula precursora de

la DA, se lograba una corrección, si bien breve, de los síntomas motores de la EP. La L-DOPA atraviesa la barrera hemato-encefálica y es metabolizada a DA en el estriado y de esa forma activa los receptores dopaminérgicos (Hornykiewicz, 2001).

Así, en 1967 George Cotzias demostró que la administración de cantidades gradualmente mayores de L-DOPA por vía oral, daba como resultado mejoría significativa y continúa de los síntomas (Cotzias et al., 1967). Aún cuando esta terapia proporcionó un avance significativo en el tratamiento farmacológico, incluso con el desarrollo de fármacos antiparkinsonianos más específicos, sólo se ha logrado controlar parcialmente algunos síntomas de la EP, mejoras que comienzan a desaparecer al cabo de cinco años de tratamiento, al tiempo que se producen molestos efectos secundarios en forma de fluctuaciones de la respuesta motora y discinesias relacionadas con el fármaco (Hornykiewicz, 2001).

La limitación y corta duración del tratamiento farmacológico en base a L-DOPA llevaron al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En 1979, se propuso como una nueva estrategia, el reemplazo de las neuronas dopaminérgicas por trasplante celular, demostrándose resultados positivos primero en modelos experimentales y posteriormente en humanos (Björklund et al., 1979; Drucker-Colín et al., 2004), pero esta opción al ser compleja y con resultados temporales, en la mayor parte de los casos, ha perdido fuerza.

Las neuronas dopaminérgicas de la SN y el AVT envían numerosas proyecciones a las regiones distantes del cerebro (Scatton et al., 1980; Swanson, 1982; Verney et al., 1985; Gasbarri et al., 1994;1997); por lo tanto, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, un sello distintivo de la EP, tiene profundas consecuencias para estas regiones remotas. En particular, las principales proyecciones dopaminérgicas de mesencéfalo al hipocampo se encuentran en la formación del hipocampo y del GD, un sitio de neurogénesis importante; los pacientes con EP muestran una disminución significativa en los niveles de DA en el hipocampo (Lang y Obeso, 2004; Schapira et al., 2006). Los mecanismos de acción de la DA en la división de los precursores neuronales está insuficientemente comprendidas, con resultados de sistemas experimentales *in vivo* e *in vitro* se han reportado efectos opuestos al aumento o agotamiento de la DA. Por ejemplo, la destrucción de las neuronas dopaminérgicas disminuye la neurogénesis en el GD en roedores y primates *in vivo* (Baker et al., 2004; Freundlieb et al., 2006); sin embargo, en un entorno experimental similar pero *in vitro* los experimentos con antagonistas del receptor de la DA, han mostrado que la supresión de la señalización de la DA puede tener un efecto opuesto, lo que sugiere que el neurotransmisor DA modula la proliferación celular en el cerebro embrionario. De particular interés, los receptores de DA del subtipo D3 contribuyen a la influencia benéfica de los agonistas dopaminérgicos para la protección y restauración de las vías dopaminérgicas en la EP (Dawirs et al., 1998; Kippin et al., 2005; Peng et al., 2008). Estos resultados contradictorios pueden reflejar un carácter complejo y multifuncional de la señalización de la DA en las células en división; además, siempre son representativas de algunos mecanismos de compensación que se activan para ayudar al sistema nervioso frente a la enfermedad.

TRATAMIENTOS

En las décadas de los años 50 y 60 Gughain, Birkmayer y Hornykiewicz siguiendo la línea de trabajo que buscaba un nuevo fármaco para el manejo de la hipertensión arterial descubren uno que revolucionaría el manejo de la enfermedad de EP (Birkmayer, 2001). Este fármaco, la L-DOPA, ha sido desde su introducción en el mercado en la década de los 70s la primera elección en el manejo de la EP.

Básicamente existen 2 reacciones a partir de las cuales la L-tirosina se transforma en DA; la primera es catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH), la cual utiliza tres cofactores para realizar su función: tetrahidrobiopterina (BH4), hierro y oxígeno que actúan sobre la L-tirosina para dar paso a la formación de L-DOPA; la siguiente reacción, es catalizada por la Dopa Descarboxilasa (DDC), que utiliza piridoxal 5'fosfato (PLP) como cofactor logrando la descarboxilación de la L-DOPA para producir DA (Vallone, 2000).

La L-DOPA atraviesa la barrera hematoencefálica y es capturada por las neuronas dopaminérgicas remanentes o bien por otras neuronas aminérgicas (catecolaminérgicas o serotoninérgicas). Debido a la presencia en el plasma de enzimas que convierten a la L-DOPA a DA, el precursor se administra a la par con de un inhibidor de las descarboxilasas periféricas, como las hidrazidas carbidopa y bencerazida, en particular la primera (Feldman, 1997; Richardson, 1982).

Sin embargo, su uso masivo y en ocasiones descuidado provocó graves complicaciones, el llamado Síndrome a largo plazo por L-DOPA, que consiste en manifestaciones psiquiátricas y motoras las que en ocasiones generan mayor discapacidad que la que la propia EP provoca (Chouza, 1976; Marsden, 1977).

Se han descrito algunas vías por las cuales, la L-DOPA puede tener efectos adversos; por ejemplo: Maharaj y cols. reportaron en el 2005, que la L-DOPA estimula la peroxidación lipídica *in vitro* en la presencia de fierro y de ácido ascórbico en homogeneizado de cerebro de ratón; y que la DA tiene una reacción química con el fierro y el ácido ascórbico, que provoca la inducción de formas hidroxiladas de los productos de la DA.

Estos efectos colaterales hicieron de la L-DOPA una alternativa de segunda línea en el manejo de la EP, privilegiándose el uso de agonistas dopaminérgicos como primera línea de tratamiento. Esta línea fue reforzada por hallazgos en algunos estudios *in vitro*, que sugerían que la L-DOPA podría ser neurotóxica (Agid, 1998; Mytilineou et al., 2003). El descrédito en que cayó fue tal, que su uso se restringió a casos severos o en cuadros avanzados. Esta idea de toxicidad, con algún grado de variación, se ha mantenido hasta la actualidad entre médicos no habituados con el manejo de la EP. Los puntos respecto al uso de la L-DOPA son por tanto dos: Las complicaciones con el uso crónico de L-DOPA y la posible neurotoxicidad de este fármaco (Jenner et al., 1998).

Respecto a las complicaciones motoras hoy se sabe, a partir de estudios *in vitro* en animales de experimentación y de la práctica clínica, que éstas dependen de la estimulación dopaminérgica pulsátil sobre el estriado (Clarke et al., 1987; Pearce et al.,

1995). El tono dopaminérgico sobre el estriado en condiciones normales es continuo, con mínimas variaciones al realizar actos motores (DeLong et al, 1983; Grace, 1991). Esta condición, se pierde en la EP, sobretodo en estadios avanzados de la enfermedad. La suplementación exógena de DA en forma de pulsos induce la promoción de ciertos genes en las neuronas estriatales, que se manifiestan por un mecanismo no del todo conocido, en discinesias (Jolkkonen et al., 1995). La estimulación dopaminérgica pulsátil ocurre, de manera más intensa con fármacos de vida media corta, como lo es la Apomorfina o la L-DOPA. Fármacos con acción dopaminérgica prolongada como lo son la mayoría de los agonistas dopaminérgicos, inducen menos discinesias o lo hacen a un tiempo de uso mucho más prolongado. Por lo tanto la aparición de discinesias no depende del uso de L-DOPA en sí mismo, sino del estímulo pulsátil que con ella se realiza en el estriado. Este fenómeno ocurre mucho frecuentemente en la EP, siendo mucho menos frecuente en pacientes que padecen otra enfermedad y que utilizan L-DOPA de manera crónica, como es el caso de distonia sensible a L-DOPA o en el Síndrome de Piernas Inquietas. Las discinesias ocurren de manera mucho más notable en la EP, porque en personas que tienen un número mínimo de neuronas en la SNc, como ocurre en las situaciones clínicas antes mencionadas e incluso en pacientes con fases iniciales de EP, estas neuronas capturan la L-DOPA la metabolizan a DA y la liberan de manera continua, evitando un estímulo pulsátil sobre el estriado. En la medida que la EP progresa el efecto amortiguador que las neuronas supervivientes poseen se pierde, produciéndose estimulación pulsátil y por tanto discinesias (Jolkkonen et al., 1995).

Por lo tanto, para evitar o retardar la aparición de discinesias se requiere que el estímulo sea lo más continuo posible. En el caso de la L-DOPA esto se logra al fraccionar la mayor cantidad de veces posible el tratamiento o prolongando su vida media al inhibir enzimas que la degradan. Así se ha demostrado que la L-DOPA asociada a Entacapone, un inhibidor de Catecol Orto Metil Transferasa (COMT), enzima que degrada L-DOPA, retarda la aparición de discinesias en el modelo experimental con MPTP (-1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- Smith et al., 2005). Una vez aparecidas, las discinesias se deben manejar con agonistas dopaminérgicos, que poseen una vida media más larga, se fraccionando las dosis de L-DOPA o agregando fármacos que prolonguen su vida media, como se mencionó antes (Chase 1998; Hughes et al., 1993).

Respecto a la neurotoxicidad se han realizado estudios *in vitro*, en modelos animales de L-DOPA y en estudios clínicos de pacientes con la EP. Los hallazgos *in vitro* son contradictorios; al administrar L-DOPA a un cultivo neuronal, estas neuronas mueren bajo ciertas circunstancias como el estrés oxidativo, sin embargo, bajo otras, como lo es con medios enriquecidos con ciertos aminoácidos u otras sustancias, L-DOPA no solo no fue tóxica, sino que además demostró tener propiedades neuroprotectoras (Langeveld et al., 1995). Por otra parte, cabe mencionar que las concentraciones que inicialmente fueron tóxicas son muy altas, imposibles de alcanzar en condiciones clínicas, se sabe que un porcentaje muy bajo de la dosis administrada vía oral, llega finalmente al cerebro (Benetello et al., 1993).

En modelos animales, primates tratados con la toxina MPTP o ratas tratadas con 6-OHDA (6-Hidroxidopamina), no se demostró, según el análisis con imágenes funcionales o con estudios patológicos, que la L-DOPA fuera tóxica (Perry et al., 1984). Los estudios funcionales, con técnicas PET o SPECT, con marcadores del transportador de DADAT (marcador presináptico) o de receptores dopaminérgicos (marcador postsináptico), no han sido concluyentes respecto a la pérdida de neuronas de la SNc que L-DOPA eventualmente induciría. En el año 2002, se publicó el primer artículo que utilizando marcador de DAT analizó el efecto de la L-DOPA y el Pramipexole sobre neuronas dopaminérgicas (Parkinson Study Group, 2002).

En suma la L-DOPA desde su descubrimiento ha sido y es la terapia más efectiva en el alivio sintomático de la EP. No hay evidencia que la L-DOPA sea neurotóxica basándose en estudios *in vitro*, en modelos animales de EP, ni estudios clínicos. Las discinesias son inducidas por la estimulación dopaminérgica pulsátil sobre el estriado y no por L-DOPA per se. Las discinesias pueden ser evitadas, su aparición retardada o ser tratadas al estimular de manera continua al estriado. La L-DOPA es la terapia más efectiva, económica y difundida para el alivio sintomático de la EP (Colzi et al., 1998).

Como la actual terapia de la EP es fundamentalmente sintomática, y con el avance de la enfermedad aparecen síntomas que no responden a la L-DOPA; es muy necesario poder disponer de una terapia que retrase la progresión de la enfermedad, y encontrar formas para proteger a grupos específicos de neuronas de otros factores que también influyen y son tan complejos como el estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, inflamación y activación glial, deficiencia de factores tróficos y, finalmente, la apoptosis. Estos distintos factores son las dianas para una terapia neuroprotectora (Mouradian, 2002).

ANTIOXIDANTES

Entre las terapias neuroprotectoras los agentes antioxidantes han sido ampliamente estudiados ya que existe evidencia de que los mecanismos oxidativos están incrementados en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de los pacientes con EP.

Las enzimas antioxidantes son un sistema de defensa que impide el daño oxidativo en macromoléculas (Rao et al., 1990), juegan un papel crucial en la protección del organismo contra el estrés oxidativo (Chance et al., 1979; Reiter et al., 1991; Leon et al., 2004).

Un antioxidante es una molécula o un ion relativamente estable, capaz de retardar o prevenir la oxidación incluso de otras moléculas (Halliwell y Gutteridge, 2010).

El cerebro es muy susceptible al daños por los radicales libres debido a sus altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados y los metales de transición tales como fierro (Cardozo et al., 2000; Escames et al., 2010). Más aún, el sistema antioxidante se ve afectado durante el envejecimiento así como la síntesis de la melatonina pineal (Akbulut, 2008).

Las células cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para hacer frente a los daños producidos por los radicales libres (Dickinson y Forman, 2002). Las vitaminas y minerales antioxidantes y otros compuestos funcionan de distintas formas: determinadas vitaminas antioxidantes donan sus electrones o moléculas de hidrógeno a los radicales libres para estabilizarlos y reducir los daños producidos por la oxidación. El sistema de enzimas antioxidante promueve que haya más antioxidantes vitamínicos, incluye la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Matés, 2000); el sistema no enzimático está formado por pequeñas moléculas tales como el α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno y glutatión (GSH) (Dickinson y Forman, 2002).

La SOD catalizan la disminución del $O_2^{\cdot-}$ para producir H_2O_2 y O^2 , se ha encontrado en mayores concentraciones en el citosol de las células, aunque también puede estar presente en el núcleo, en la mitocondria, protegiendo a este organelo de los $O_2^{\cdot-}$ producidos durante el transporte electrónico mitocondrial (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La CAT cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O y O^2 . La mayoría de las células contienen catalasa en los peroxisomas; organelos que, por otra parte, contienen muchas de las enzimas generadoras de H_2O_2 de las células (Dunlop y Steeves., 2003).

La GPx cataliza la reducción del H_2O_2 y de hidroperóxidos orgánico, se localiza fundamentalmente en el citosol de las células, aunque también puede localizarse en las mitocondrias (Jackson et al., 2002). La GRD cataliza la reducción de glutatión oxidado utilizando equivalentes redox en forma de NADPH. Su localización es citosólica y mitocondrial (Jackson et al., 2002; (Dunlop y Steeves, 2003).

Además de las enzimas descritas anteriormente, existe otra línea de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática, secuestrando a los radicales libres que escapan

de las enzimas antioxidantes. Dentro de este grupo se encuentran diversas proteínas y moléculas como el glutatión, la vitamina C, el ácido úrico y la taurina, entre otros (Gil y Rabelo, 2010).

El glutatión (GSH) puede reaccionar con especies como el H_2O_2 u otros peróxidos orgánicos, con radicales libres como $\text{O}_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} (Gil y Rabelo, 2010).

La vitamina C o ácido ascórbico reacciona con el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el OH^{\cdot} y diversos hidroperóxidos lipídicos, restauran las propiedades antioxidantes de la vitamina E (Thompson et al., 2008; Gil y Rabelo, 2010). La vitamina E es un conjunto de compuestos denominados tocoferoles. De todos estos el que posee una mayor actividad antioxidante es el α -tocoferol. La vitamina E se ha encontrado en la membranas de la mayoría de las células. La molécula de tocoferol es capaz de reaccionar con especies reactivas de oxígeno como los radicales peroxilo (ROO^{\cdot}) (Thompson et al., 2008). El β -caroteno, que es un precursor de la vitamina A, se encuentra en elevadas concentraciones en las membranas de distintos tejidos. Este carotenoide además de secuestrar oxígenos, es capaz de reaccionar con los radicales peroxilo que se generan durante la peroxidación de lípidos (Thompson et al., 2008; Gil, 2010).

MELATONINA

La melatonina posee propiedades antioxidantes, sin embargo no entra en la categoría de antioxidantes.

La melatonina es una neurohormona liposoluble sintetizada principalmente en la glándula pineal por los pinealocitos (Hardeland et al., 2011), también es secretada a través de la glándula pineal al tercer ventrículo (Tricoire et al., 2002; 2003), se difunde en los capilares y en el líquido cerebroespinal. Como la melatonina pasa a través de todas las membranas biológicas con facilidad, el tejido cerebral puede tener mayores niveles de melatonina que otros tejidos del cuerpo (Tan et al., 2010). Sin embargo, en la mayoría de las partes del sistema ventricular y en el canal espinal, las concentraciones de melatonina son menores en comparación con la glándula pineal (Hardeland, 2011).

La melatonina está involucrada en múltiples procesos biológicos. Posee funciones adicionales como un factor tisular local y acciones paracrinas y autocrinas (Tan et al., 2003). Es una indolamina (N-acetil-5-meto-xitriptamina) (Figura 6), la cual regula los ritmos circadianos por el efecto que ejerce sobre el hipotálamo en el núcleo supraquiasmático (NSQ) durante la fase oscura del fotoperiodo. Sin embargo, sus funciones son mucho más amplias, en términos de los sitios de biosíntesis y acción (Tan et al., 2003; Hardeland et al., 2010).

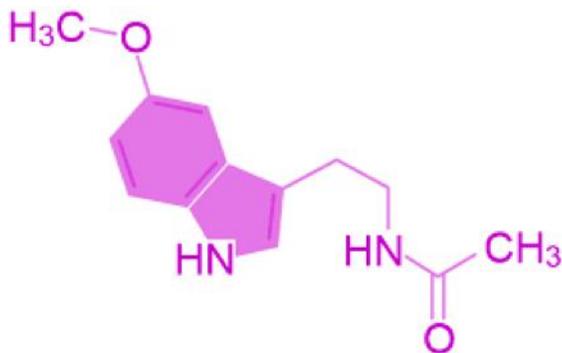


Figura 6. Dibujo de la molécula de la Melatonina (Yoshikazu et al., 2010).

La melatonina se sintetiza de la serotonina en dos pasos, *N*-acetilación a *N*-acetilserotonina seguido por *O*-metilación (Leu-Semenescu et al., 2010). Su principal vía de catabolismo es mediante 6-hidroxilación por monooxigenasas hepáticas, los tejidos pueden ser vías alternas de catabolismo, pero son de menor importancia cuantitativa (Pandi-Perumal et al., 2006).

La melatonina está presente en numerosos órganos y células, tales como el tracto gastrointestinal, la médula ósea, varios leucocitos, la membrana de la cóclea, la piel, y otras regiones. Cantidades altas de melatonina entran en la sangre desde el tracto gastrointestinal en respuesta a factores nutricionales (Bubenik, 2002).

Aparte de regular los ritmos circadianos, la homeostasis del sueño, la neuromodulación de la retina, y las respuestas vasomotoras. Las propiedades antioxidantes de la melatonina pueden ser directas e indirectas (Seithikurippu et al., 2012). Directamente es un barrador de radicales libres, neutraliza el carbonato hidroxilado y varios radicales orgánicos, así como especies reactivas de nitrógeno (ERN). Indirectamente mejora el potencial antioxidante mediante la estimulación del sistema enzimático antioxidante incluyendo la SOD, la GPx, y GRD, y mediante el aumento de los niveles de GSH. Preserva la homeostasis mitocondrial, reduce la generación de radicales libres y protege las mitocondrias (Galano et al., 2011). Contiene efectos sedantes, antiexcitatorios y anticonvulsivos que comprenden diferentes acciones, tales como la modulación de los receptores de glutamato entre otros (Hardeland y Poeggeler, 2008).

La melatonina puede actuar a través de dos receptores de membrana acoplados a proteína G: MT1 y MT2 (Dubocovich et al., 2010). Los receptores MT1 y MT2 están acoplados a proteínas G, presentes en numerosos tejidos como la retina, el hígado, el intestino, los riñones, las adrenales, el timo, la glándula tiroidea, las células inmunes, el páncreas, los ovarios, el cuerpo carotideo, la placenta y el endometrio (Dubocovich y Markowska, 2005; Hardeland et al., 2010), en el SNC se encuentran en la SNc, amígdala, corteza cerebral, glándula pineal; específicamente el receptor MT2 está presente en hipocampo y retina. El MT1 se encuentra en mayores concentraciones en las capas I a IV de la corteza cerebral, en el sistema cerebrovascular especialmente en la arteria intrahipocámpal (Savaskan et al., 2001; 2002; Brunner, 2006; Savaskan et al., 2007; Tovinet et al., 2010). Ambos receptores están presentes en el NSQ de la mayoría de las especies (Hardeland et al., 2011). La melatonina promueve el sueño mediante la activación del receptor MT1 del NSQ (Saper et al., 2005; Fuller et al., 2006).

Los receptores MT1 y MT2 ejercen acciones opuestas en el sistema vascular, la activación de MT1 causa vasoconstricción, y la de MT2 vasodilatación (Dubocovich y Markowska, 2005).

Además de la unión a receptores MT1 y MT2, la melatonina muestra afinidad por otro sitio de unión (MT3), el cual es una enzima, quinonoreductasa 2 (QR2 o NQO2) (Nosjean et al., 2000). Protege contra el estrés oxidativo resultante de la transferencia de electrones de quinonas, pero hay poca información sobre él (Harada et al., 2001).

En ratones knockout MT2, se ve alterada la LTP (Larson et al., 2006), un hallazgo de interés en términos de plasticidad neuronal y aprendizaje. Ratones knockout MT1 muestran déficit sensoriomotor gradual y mayores tiempos de inmovilidad en las pruebas de natación forzada, que suele interpretarse como una indicación del comportamiento depresivo (Weil et al., 2006).

Otros sitios de unión de la melatonina es la familia del receptor nuclear del ácido retinoico, el receptor ROR α y ROR β (Carlberg, 2000). ROR α se expresa en altos niveles en los linfocitos T y B, en neutrófilos y monocitos (Lardone et al., 2011), mientras que ROR β se encuentra en la glándula pineal, la retina, el bazo, en sitios de unión relacionados con el metabolismo dependiente de Ca y en las mitocondrias (Hardeland, 2009).

La melatonina también puede actuar directamente sobre las células a través de su unión a CaM (Benítez-King, 2006), tubulina (Cardinali y Freire, 1975), calreticulina y, tal vez, otras proteínas de unión al Ca²⁺ (Macias et al., 2003).

Se ha reportado el efecto neuroprotector de la melatonina, el cual se puede explicar por su propiedad como barredor de radicales libres y estimulante del sistema antioxidante (Reiter, 2003), al disminuir los niveles de peroxidación de lípidos (Gutiérrez, 2007), como el malondialdehído (MDA) en la corteza frontal (Mogulkoc et al., 2006; Akbulut, 2008) y aumentando los niveles de enzimas antioxidantes (Öztürk et al., 2012).

En el hipocampo se expresan ampliamente los receptores para melatonina MT1 y MT2 sobre todo en el giro dentado y con mayor grado en la zona CA3, CA1 y el subiculum. La expresión de ARNm para los receptores MT1 y MT2 en el hipocampo sugiere que la melatonina puede ejercer efectos sobre la fisiología del hipocampo a través de estos receptores. Dado que la melatonina ejerce sus efectos probablemente a través de los receptores MT1 y / o MT2 específicos de la proteína G acoplada, se puede especular que los mecanismos intracelulares están implicados en el cambio de la excitabilidad. Estos mecanismos podrían inducir cambios continuos en el estado de las células (Musshoff et al., 2002). El receptor de melatonina MT2 se encuentra en mayor concentración en el hipocampo, donde se cree que está involucrado en la modulación de la plasticidad sináptica y la función cognitiva. Es importante destacar que la disminución significativa en la expresión del MT2 se ha observado en el hipocampo de los pacientes que padecen Alzheimer (Bahna et al., 2014).

MELATONINA Y PARKINSON

Después de que se descubrieron las propiedades antioxidantes de la melatonina esta ha sido probada con éxito en varios experimentos *in vivo* e *in vitro* de la EP y se encontró que inhibe los efectos prooxidantes de la DA y L-DOPA y que es más eficaz que la vitamina E, en la prevención de la autooxidación de la dopamina (Carocci et al., 2014).

En la EP se ha demostrado que existe una elevación nocturna del nivel de melatonina en algunos pacientes tratados con L-DOPA, esta observación sugiere que la L-DOPA podría modificar el patrón de secreción de melatonina. Además de su papel en la sincronización de ritmo biológico, la melatonina también ejerce efectos motores directos a través de interacciones con las vías de DA y serotonina, lo que sugiere que la presencia o ausencia de complicaciones motoras relacionadas con la L-DOPA (LDRMCs) también pueden ser influenciados por cambios en el patrón de secreción de melatonina. LDRMCs ocurren en al menos de la mitad de los pacientes con EP después de los primeros 5 años de tratamiento. Ambos mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos han sido evocados para explicar los diferentes efectos motores secundarios. Episodios wearing-off suelen estar relacionados con cambios en las propiedades farmacocinéticas centrales y periféricas de la L-DOPA, mientras que las discinesias o en fenómenos ON/OFF se considera que están generalmente relacionadas con cambios farmacodinámicos centrales que implican la expresión del receptor de la DA D3 o la sensibilidad, en particular, la hipersensibilidad de receptores D2. La melatonina podría estar implicada en los cambios de la sensibilidad del receptor de DA D3, ya que se ha demostrado experimentalmente que la administración de melatonina es capaz de aumentar la sensibilidad del receptor de dopamina D2. Sin embargo, la implicación de la melatonina en la fisiopatología de los efectos secundarios de la L-DOPA todavía no se ha investigado (Bordet et al., 2003).

JUTIFICACIÓN

En los reportes clínicos de pacientes con la EP es común que se mencione entre los síntomas alteraciones de memoria, principal síntoma en demencias seniles y que nos indica que probablemente exista alteración a nivel del hipocampo. Actualmente se sabe que este núcleo recibe inervación dopaminérgica del mesencéfalo, incluyendo a la SNc. En pacientes con EP se ha reportado déficit en la proliferación neuronal en el GD, presumiblemente como consecuencia de la denervación dopaminérgica; aunque también está la posibilidad de que esta pérdida se deba a que el tratamiento de la EP es la administración de L-DOPA, sustancia que es tomada por las terminales dopaminérgicas remanentes y metabolizada para producir DA; durante este proceso hay una producción exacerbada de radicales libres y estos también podrían estar alterando los procesos normales en el GD.

Debido a que la melatonina muestra propiedades antioxidantes muy importantes consideramos relevante probar si al administrar por vía oral este fármaco, sólo o en combinación con L-DOPA, se puede favorecer la neurogénesis en el hipocampo de animales con el modelo experimental de la EP.

OBJETIVO:

Examinar la capacidad de la L-DOPA (7.5 mg/kg) y/o Melatonina (10 mg/kg) para modular la neurogénesis en el hipocampo de ratas con el modelo de la EP

OBJETIVOS PARTICULARES:

Conteo de neuronas TH remanentes en la SNc.

Comparar la tasa de neurogenesis en el Hipocampo de animales con el modelo de la EP y que recibieron L-DOPA y/o Melatonina.

Comparar la relación de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNc y la tasa de neurogenesis en el GD de hipocampo.

Comparar la proliferación en la ZSV animales con el modelo de la EP y que recibieron L-DOPA y/o Melatonina.

A grayscale microscopic image of a neural network, showing a dense web of interconnected neurons with their cell bodies and branching processes. The neurons are distributed across the entire frame, creating a complex, interconnected pattern.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron 36 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 180 a 200gr. mantenidas en condiciones de laboratorio con foto-periodos de 12/12h (luz-obscuridad) con acceso libre a agua y alimento.

LESIÓN

Las ratas se lesionaron quirúrgicamente: se anestesiaron por vía intraperitoneal (IP) con pentobarbital sódico a una dosis de 35 mg/kg de peso. Posteriormente fueron fijadas en un aparato estereotáxico para ser lesionadas unilateralmente (lado izquierdo) en el haz medial del cerebro anterior (mfb) zona por la que pasan los axones nigrales. Se realizó el trépano con un taladro pequeño (mototool, Dremel) en la posición específica respecto a Bregma AP=-3, L=1.6, V=-8.0 a partir de la dura madre de acuerdo a Paxinos y Watson (1986). Se inyectó 8µg de 6-OHDA (H4381, Sigma, Truong, 2006) diluida en 4µl de solución vehículo (solución salina al 0.9% y ácido ascórbico 1%) en esta zona por medio de una jeringa Hamilton acoplada a una micropipeta de vidrio de diámetro entre 50 y 100µm.

Se realizó el mismo procedimiento para los animales del grupo Sham, con la diferencia que a estos se les inyectó solución vehículo en lugar de 6-OHDA.

GIRO INDUCIDO

Dos días posteriores a la lesión se administró a los animales una dosis de apomorfina (A4393, Sigma) de 0.25mg/kg por vía IP. Para evaluar el giro inducido, se colocó una rata a la vez, en cajas de acrílico transparente de 60X50cm y se registró el número de giros que daba cada rata hacia el lado contralateral a la lesión (derecho). Se tomaron para el estudio las ratas que giraron 200 o más veces en un periodo máximo de 30 minutos, pudiendo repetir la prueba por dos ocasiones consecutivas (cada 24 horas). Las ratas que no cumplían el criterio no se emplearon, los grupos se formaron incluyendo 6 ratas por grupo.

TRATAMIENTO

Después de 24 horas de la prueba de giro inducido, se inició la administración de los tratamientos farmacológicos particulares para cada grupo durante 60 días (ver tabla 2). Los fármacos se administraron por vía oral mediante una jeringa de 1ml sin aguja. Cabe mencionar que aquellos grupos a los que se les administró L-DOPA se diluyó en agua. Por otra parte, al grupo IV que se le administró Melatonina (M5250, Sigma) se mezcló con Cerelac de Nestlé® en proporción 1:1 diluido con un poco de agua.

Tabla 2. Protocolo de tratamiento

GRUPO	INYECCIÓN EN EL HAZ TRATAMIENTO MEDIAL	
Grupo Control	-----	-----
Grupo Sham	Solución vehículo	-----
Grupo 6-OHDA	6-OHDA	-----
Grupo L-DOPA	6-OHDA	7.5mg/kg de L-DOPA
Grupo Melatonina	6-OHDA	10mg/kg de Melatonina
Grupo L-DOPA/Melatonina	6-OHDA	7.5mg/kg de L-DOPA + 10mg/kg de Melatonina

ADMINISTRACIÓN DEL BrdU.

Para los estudios de proliferación celular se administró 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (B5002, Sigma); este es un nucleótido sintético análogo de la Timidina o Timina que se incorpora al ADN celular durante los procesos de replicación (fase S de mitosis). Se administró en una dosis de 50 mg/kg por vía IP cada tercer día durante las primeras dos semanas del tratamiento (8 inyecciones en total por rata) para la marcación de neuronas de nueva creación.

PERFUSIÓN INTRACARDIACA.

Al finalizar la aplicación de los tratamientos se sacrificaron los animales mediante perfusión intracardiaca vía aórtica; inicialmente pasando solución salina isotónica (0.9 % NaCl) seguida de fijador: Paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos salino (PBS 0.1 M, p.H. 7.4; Ávila-Costa et al., 2006) (Apéndice 1). Ya perfundidos los animales se extrajeron los cerebros y se colocaron en fijador por 24 hrs. Posteriormente se realizaron cortes coronales de 50 µm con un vibratomo (Pelco 101 de Ted Pella Inc.) para tomar rebanadas de mesencéfalo conteniendo la SNc ipsilateral y contralateral a la lesión con el fin de procesarlos con la técnica de inmunocitoquímica para TH y del hipocampo ipsi y contralateral para la inmuno BrdU y NeuN.

INMUNOHISTOQUIMICAS.

Se realizó el análisis inmunohistoquímico para el conteo de neuronas inmunorreactivas a NeuN (MAB 377B, Millipore) y BrdU (MAB 3222, Millipore) en el Giro dentado del Hipocampo ipsilateral y contralateral a la lesión en 6 cortes coronales por cerebro (ver anexo).

Las fotografías fueron tomadas con ayuda de una cámara (Moticam 1000 de Motic y software Motic Images Plus 2.0ML) acoplada a un microscopio óptico (Nikon). El análisis estadístico utilizado fue ANOVA y prueba de Tukey con el Software (GraphPad Prism 4).



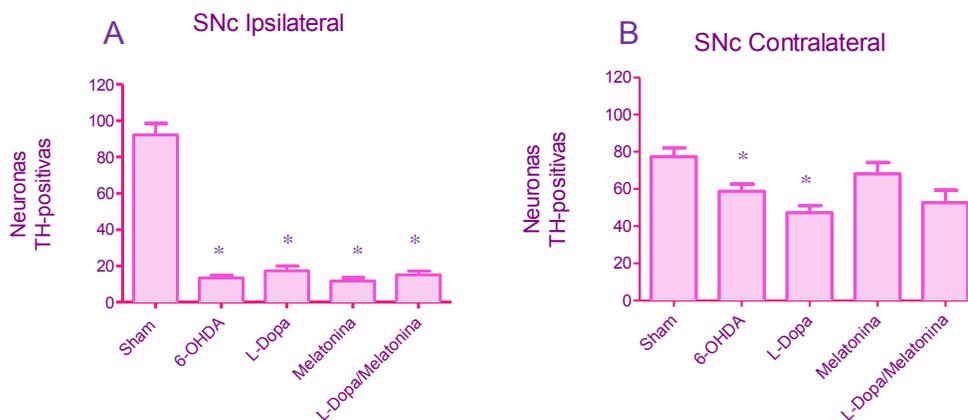
RESULTADOS

RESULTADOS

Empleando doble marcaje con inmunohistoquímica para BrdU (que marca células en proliferación) y NeuN (marcador neuronal), hemos examinado el efecto de la pérdida de la proyección dopaminérgica sobre la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo, esta zona recibe inervación dopaminérgica de la SNc; al trabajar con un modelo de la EP se hace una primera evaluación *in vivo* midiendo el giro inducido por el agonista dopaminérgico Apomorfina. Previamente se señaló que solo se emplearon animales que dieron 200 o más giros en un periodo de 30 min de observación, dato que se ha relacionado con disminución de los contenidos de DA estriatal en más del 80% (Hefti et al., 1980); como complemento para asegurar el grado de depleción dopaminérgica realizamos inmunocitoquímica (anti-TH) para marcar neuronas dopaminérgicas e hicimos el conteo de las mismas en la SNc.

CONTEO DE NEURONAS TH EN LA SUBSTANCIA NIGRA

La inyección unilateral de 8µg de 6-OHDA en el haz medial indujo pérdida significativa de neuronas positivas a TH, es decir neuronas dopaminérgicas, en la SNc compacta ipsilateral a la inyección (llegando a perderse hasta el 86% de las neuronas) comparada con el lado contralateral (gráfica 1 A y B) que en promedio se contaron 84.83±14.3 neuronas TH+ por corte, cabe destacar que en todos los casos también se presentó pérdida importante de neuronas TH+ (entre 25 a 35%) en el lado contralateral a la lesión al comparar con el grupo sham.



Grafica 1. Neuronas dopaminérgicas remanentes. Podemos observar que el número de neuronas TH+ remanentes en la SNc disminuyó en todos los grupos de animales con inyección de 6-OHDA, del lado ipsilateral a la lesión (A) comparados con del grupo Sham. (*= $p \leq 0.05$). (B) En la SNc contralateral podemos observar que el grupos con 6-OHDA y el tratado con L-DOPA tienen una disminución en la cantidad de neuronas TH+, mientras que los grupos Sham, Melatonina y Malatonina/L-DOPase mantuvieron muy parecidos al grupo control (*= $p \leq 0.05$ Vs Sham).

CONTEO DE NEURONAS BrdU/NeuN+ EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO

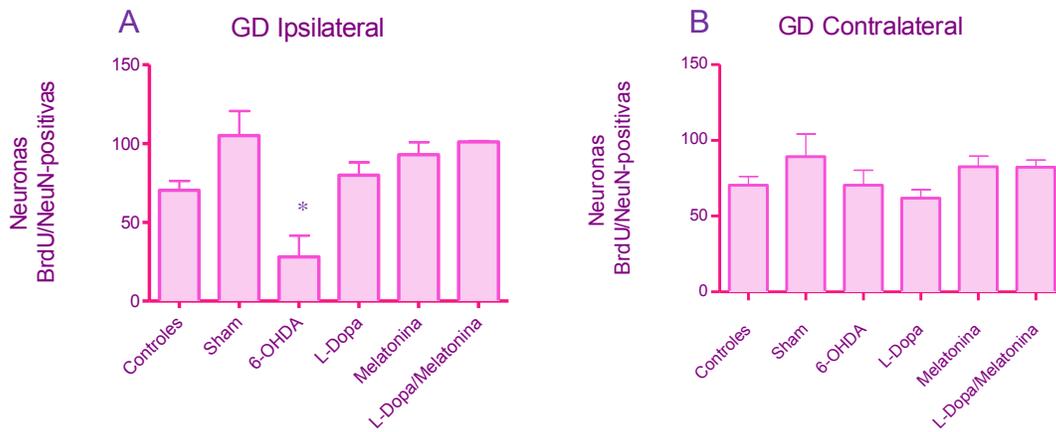
Para realizar el conteo en la zona del hipocampo empleamos una doble marca con anticuerpos para BrdU y NeuN (Fotomicrografía 1 y 2), el primero marca células en proliferación y el segundo es un marcador neuronal. Cabe destacar que las células proliferantes en esta zona son capaces de integrarse al sistema, hacer contactos sinápticos funcionales a partir de los 21 días de su generación, y recibir inervaciones de otros núcleos (Vivar et al., 2013) en nuestro caso se sacrificó a los animales después de 60 días de tratamiento farmacológico, período durante el cual también se mantuvo a los grupos control y sham.

Una vez realizado el conteo de las neuronas inmunopositivas para BrdU/NeuN (neuronas de nueva generación) del GD contralateral (no lesionado) e ipsilateral (lesionada con 6-OHDA, lesión falsa en el grupo Sham) (gráfica 2) observamos que el grupo control (70 ± 5.86 neuronas) y el grupo Sham (89.14 ± 15 neuronas) mantuvieron un número similar de neuronas de nueva generación en ambos lados del GD, lado depletado de DA y lado intacto.

En cuanto al lado ipsilateral a la lesión el grupo lesionado con 6-OHDA presenta una disminución significativa en el número de neuronas inmunopositivas para BrdU/NeuN respecto a los otros grupos teniendo en promedio 28 ± 13.69 neuronas con la doble marca. El grupo Sham presentó valores más altos de neurogénesis (promedio de 105 ± 15.52 neuronas) respecto al grupo control que en promedio tuvo 70.3 ± 5.86 neuronas por campo, la diferencia no es estadísticamente significativa, cabe destacar que entre estos dos grupos la diferencia central es la lesión mecánica producida en el grupo sham durante la inyección de la solución vehículo.

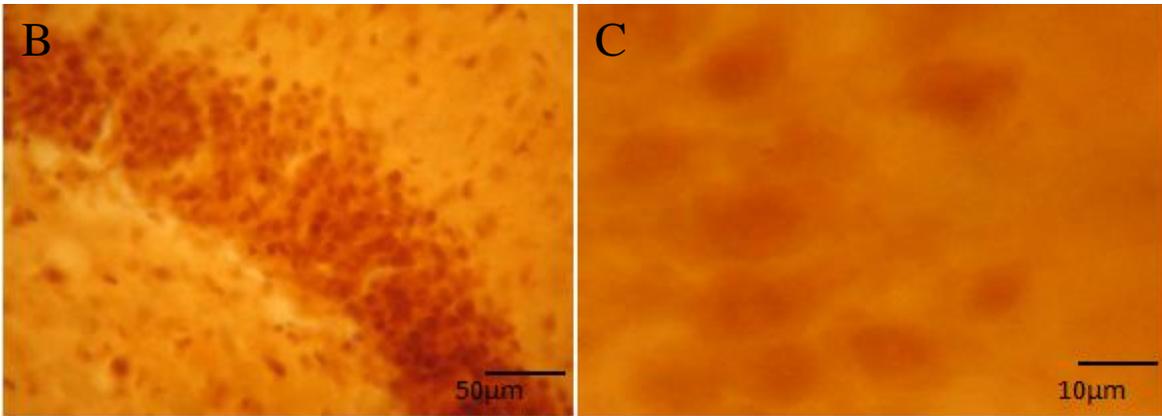
Del lado contralateral los grupos tratados con Melatonina y con Melatonina/L-DOPA no presentaron diferencias respecto a los controles (promedio de 82 ± 6.88 neuronas por grupo). Es importante señalar que el único grupo que presentó diferencias aunque no estadísticamente significativas con fue el grupo tratado con L-DOPA en el que hubo una disminución en el número promedio de neuronas con ambos marcadores (61.9 ± 5.51 neuronas).

Mientras que los grupos tratados con Melatonina (promedio de 93 ± 0.05 neuronas con doble marca) y Melatonina/L-DOPA (101 ± 0.48 neuronas por campo) presentaron un aumento respecto al grupo 6-OHDA, el grupo tratado con L-DOPA (promedio de 80 ± 8.07 neuronas) mantuvo un número similar de neuronas respecto al grupo Control (70 ± 5.86 células con doble marca).

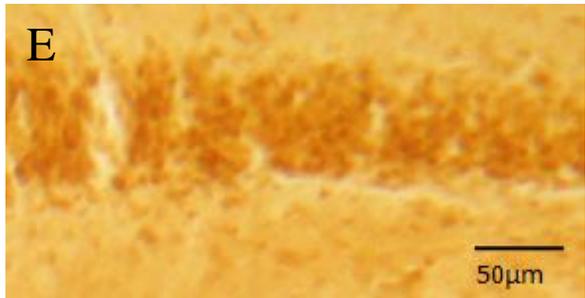
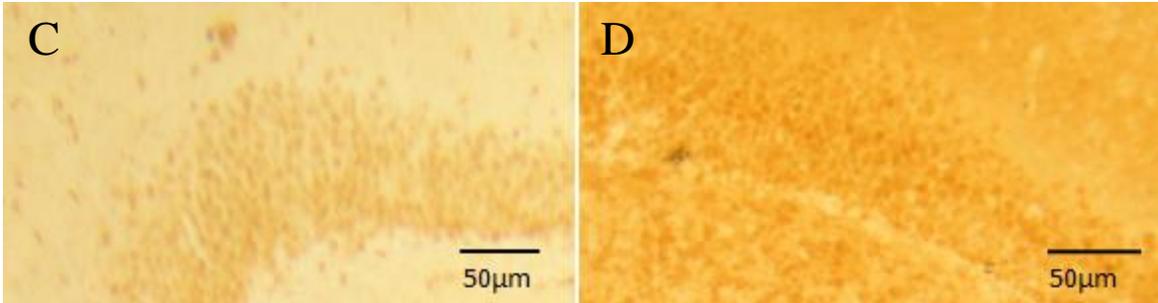
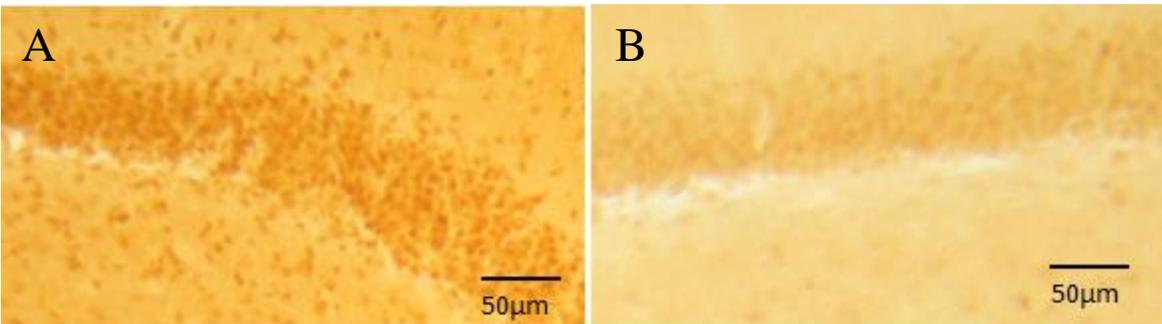


Gráfica 2. Células inmunopositivas para BrdU/NeuN en el giro dentado. La inyección de 6-OHDA reduce la presencia de neuronas positivas a BrdU/NeuN, y la administración de L-DOPA y melatonina revierte este efecto. * = $p \leq 0.05$ vs control.





Fotomicrografía 1. (A)(B)(C) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado del grupo control marcadas con BrdU/NeuN de ratas.



Fotomicrografía 2. Neuronas granulares del GD marcadas con BrdU/NeuN de ratas expuestas a 60 días de tratamiento. (A) grupo Sham, (B) grupo 6-OHDA, (C) grupo L-DOPA, (D) Melatonina, (E) grupo L-DOPA/Melatonina.

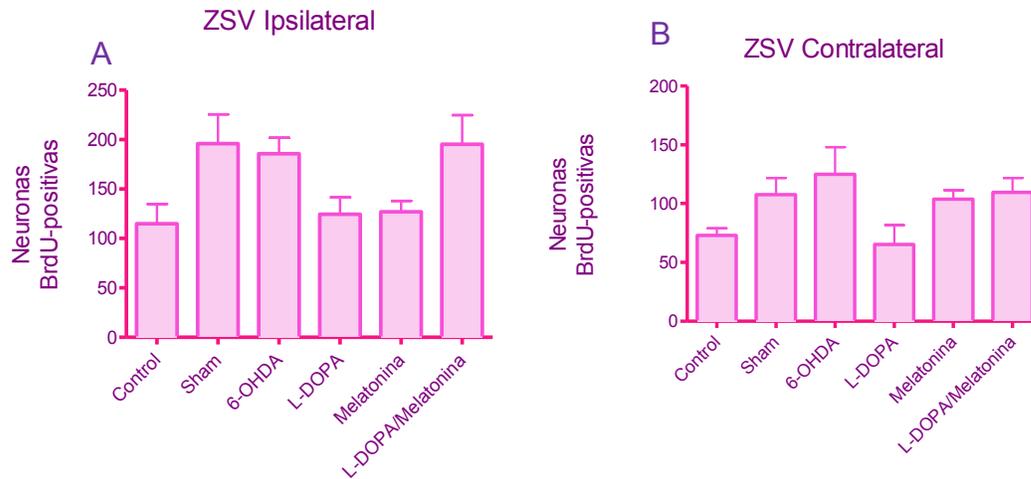
CONTEO DE NEURONAS BrdU+ EN LA ZONA SUBVENTRICULAR

Como señalamos previamente el proceso de neurogénesis implica proliferación y diferenciación, en el caso de los datos presentados en esta sección donde se hizo el conteo de células que contienen BrdU (marcador de división celular) y NeuN (marcador de fenotipo neuronal) estamos presentando células diferenciadas. Para complementar la información e investigar un poco más sobre el proceso de proliferación hicimos el conteo de células con BrdU en la zona Subventricular.

En el caso del conteo realizado en la zona Subventricular, se hizo para ver el efecto de la depleción dopaminérgica sobre una zona que se sabe tiene potencial de proliferación celular, y que recibe inervación de la SNc (Höglinger et al., 2014).

En este caso para realizar el conteo se empleó sólo el marcaje con inmunohistoquímica para BrdU (que marca células en proliferación), la gráfica 3(A) en el lado ipsilateral, muestra un leve aumento en la proliferación celular tanto en los grupos Sham como en el grupo 6-OHDA con respecto al grupo control (aprox. 30%), los grupos Sham (con 195 ± 29.30 células positivas a BrdU) y 6-OHDA (con 185 ± 16.12 células positivas a BrdU) se comportaron del mismo modo que el lado contralateral presentando un ligero aumento en la proliferación; en el grupo con L-DOPA/Melatonina, Melatonina y L-DOPA se mantuvieron igual que el grupo control (127 ± 11.08 y 124 ± 17 células en promedio respectivamente); aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

En cuanto al lado contralateral gráfica 3(B) el grupo tratado con L-DOPA (promedio de 65 ± 16.38 células) presenta una leve disminución en el número promedio de células marcadas y el grupo tratado solo con Melatonina no presentaron ningún cambio en el número de células positivas a BrdU (promedio 103 ± 7.66 células).



Grafica 3. Proliferación celular en la Zona Subventricular. Al comparar los grupos experimentales se observa que ante la inyección se incrementó, aunque no significativamente, el número de células en proliferación del los grupos Sham, el lesionado con 6-OHDA y el grupo tratado con L-DOPA/Melatonina. Mientras que los grupos L-DOPA y Melatonina mantienen sus niveles sin cambios respecto al control. En el lado contralateral (B) hubo tendencia a incrementar la proliferación en el grupo 6-OHDA, mientras que el grupo L-DOPA se presenta una leve disminución en la proliferación celular.

DISCUSIÓN

La neurogénesis adulta, una forma específica de la plasticidad del cerebro en los mamíferos que se produce en la zona Subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG), está sujeta a las regulaciones complejas. La DA se ha identificado como un factor regulador en roedores, primates no humanos, y seres humanos. La SNc inerva a la ZSV y la parte inferior y superior del GD, incluyendo la ZSG. Con base en estos resultados, se sugiere que las zonas neurogénicas están en condiciones de ser afectadas por los cambios de los niveles de DA en la SNc (Höglinger, 2004).

Las neuronas dopaminérgicas de la SNc y el AVT envían numerosas proyecciones a las regiones distantes del cerebro incluyendo al hipocampo (Gasbarri et al., 1997, 1994, Scatton et al., 1980, Swanson 1982, Verney et al., 1985); por lo tanto, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, un sello distintivo de la EP, puede tener profundas consecuencias para estas regiones remotas. En particular, las principales proyecciones dopaminérgicas del mesencéfalo se encuentran en la formación del hipocampo y del GD, el sitio de la neurogénesis adulta persistente (Fotomicrografía 1y 2); los pacientes con EP muestran una disminución significativa en los niveles de DA en el hipocampo (Lang y Obeso, 2004; Schapira et al., 2006). Se ha demostrado experimentalmente que la depleción de DA disminuye la generación de nuevas neuronas, tanto en la ZSV como en el GD del hipocampo (Fotomicrografía 1y 2), lo que concuerda con nuestros resultados (gráfica 2A) donde se observa que los grupos tratados con la neurotoxina 6-OHDA tienen una pérdida de la proliferación. La DA activa específicamente a los receptores de DA presentes en el hipocampo (Liggins, 2012), regulando mediante este mecanismo la neurogénesis en el cerebro adulto (Baker et al., 2004; Coronas et al., 2004; Borta et al., 2004). Estos hallazgos sugieren que la proliferación celular en el GD puede estar, al menos en parte, regulada por la inervación dopaminérgica de la SNc (Scatton et al., 1980; Gasbarri et al., 1997).

Höglinger y colaboradores en el 2004 informaron del efecto de la denervación dopaminérgica sobre la proliferación celular en el GD de ratones tratados con la neurotoxina MPTP induciendo una pérdida completa de neuronas y fibras dopaminérgicas en la SNc que después de 70 días se recuperaban por completo. La proliferación celular en el GD primero disminuyó y luego se recuperó en paralelo con la denervación y reinervación dopaminérgica respectivamente.

Trabajos previos han demostrado que la DA es un potente estimulador de la proliferación de células precursoras neurales endógenas en la ZSV de roedores adultos (Baker et al., 2004; Coronas et al., 2004; Höglinger et al., 2004; Van Kampen et al., 2004; Winner et al., 2006). Aunque también se ha reportado la capacidad de la DA para inhibir a las células madre de roedores adultos (Kippin et al., 2005), su efecto estimulante sobre las células precursoras parece predominar *in vivo* (Coronas et al., 2004; Höglinger et al., 2004). En la ZSV de roedores adultos, la estimulación dopaminérgica aumentó la producción de células precursoras (Höglinger et al., 2004; Van Kampen et al., 2004), mientras que el agotamiento de la DA redujo la producción de células precursoras (Baker et al., 2004; Höglinger et al., 2004; Winner et al., 2006). El agotamiento de la DA en macacos de edad resultó en la disminución significativa en la proliferación celular en la ZSV, en correlación con la pérdida de la inervación dopaminérgica, y en una disminución en el número de PSA-NCAM+ (marcador de neuronas inmaduras) neuroblastos. Estas observaciones sugieren que el efecto estimulante de la dopamina sobre la proliferación de células precursoras en la ZSV del adulto es funcional y filogenéticamente conservada en roedores y primates (Freundlieb et al., 2006) Además de su función bien conocida en la

regulación del estado de ánimo, la motivación, y el movimiento, las células dopaminérgicas de la SNc también participan en la regulación de la neurogénesis adulta a través de sus proyecciones dopaminérgicas a la ZSV y al GD del hipocampo. El efecto de la disminución de DA en la producción de células precursoras puede tener importantes implicaciones para las enfermedades humanas. El agotamiento crónico de DA en los seres humanos, como ocurre en la EP, podría dar lugar a una reducción consistente en la producción de células precursoras, como había sido sugerido por los resultados de los modelos de roedores de la enfermedad (Baker et al., 2004; Höglinger et al., 2004; Winner et al., 2006).

Por lo tanto, la alteración crónica del suministro de proyecciones dopaminérgicas a la zona neurogénica del hipocampo podría ser la base de la confusión y a la baja de la memoria tan común en pacientes con EP (Berendse et al., 2001).

Por el contrario, la estimulación de la neurotransmisión dopaminérgica por medios farmacológicos podría resultar beneficiosa en enfermedades degenerativas.

Modelos experimentales han demostrado que tras una lesión mecánica o química se potencia la neurogénesis en la ZSV del cerebro. En estos trabajos se ha visto que neuroblastos de esta región modifican su vía de migración para dirigirse a la zona de la lesión, donde se diferencian a neuronas (Gráfica 3). Estas células recién formadas intentan sustituir la pérdida celular consecuente a la lesión. Sin embargo, la mayoría de las células que provienen del nicho neurogénico de la ZSV experimentan procesos de muerte celular por apoptosis durante este proceso, y el número de neuronas que consiguen integrarse en la zona lesionada no es suficiente como para obtener signos de recuperación funcional (Otero et al., 2010).

En nuestra experiencia, cuando realizamos la lesión con la neurotoxina, se observa que los animales muestran a nivel de la ZSV un número mayor de células BrdU positivas no lo, respecto de los animales control. La ZSV no solo es un nicho neurogénico sino también donde existe proliferación de glia, se ha demostrado que estas células migran progresivamente a la zona de lesión, y 6 meses después del trasplante algunas de las células recién formadas que alcanzan esta zona de lesión expresan un fenotipo de neuronas inmaduras (B-III tubulina). Es posible admitir, por tanto, que la neurogénesis endógena, activada por la lesión se suma a la neurogénesis que ya existe en el sistema.

Es lógico, por tanto, suponer que la búsqueda de mecanismos de neuroprotección, inhibiendo la apoptosis de las neuronas recién generadas, puede aumentar la supervivencia de éstas y a su vez reflejarse en la mejora en del sistema. En este sentido, juega un papel muy importante el medio en que se encuentran las células proliferantes de la ZSV, recientemente se ha demostrado que la melatonina gracias a su efecto neuroprotector es capaz de mantener un ambiente estable capaz de aumentar la supervivencia y las posibilidades de que estas células nuevas se integren al sistema (Otero et al., 2012).

Nuestros resultados muestran que los grupos Sham que presento una lesión mecánica y el grupo 6-OHDA lesionado con la neurotoxina presentaron un aumento en la proliferación de neuronal (ver grafica 2) pero no hay diferencia significativa lo cual se puede deber a la expresión de diversos factores de crecimiento como BDNF, IGF-I, EGF, HB-EGF, VEGF que están involucrados en la neurogénesis en el GD del hipocampo y además participan como factores protectores del daño neuronal o como factores inductores durante la

generación y diferenciación de nuevas células que reemplacen a las células lesionadas. Se ha demostrado que la administración intracerebroventricular del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) incrementa la neurogénesis en el bulbo olfatorio. Además, se sabe que el BDNF es necesario para mantener la tasa de neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos. Por otro lado, la infusión por vía periférica del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) incrementa la neurogénesis en el hipocampo de ratas adultas (Berghauzen et al., 2015).

Se ha reportado que la lesión con 6-OHDA baja los niveles de BDNF y otros factores neurotróficos en la zona C3, C1 y GD. El aumento de la cantidad y/o disponibilidad de FGF-2 parece ser crítico para la neurogénesis después de una lesión cerebral. Yoshimura y colaboradores demostraron en el 2001 que la sobreexpresión de FGF-2 aumenta la neurogénesis en el hipocampo, mientras que la deficiencia de FGF-2 disminuye la neurogénesis en el cerebro adulto en respuesta a una lesión. Por lo tanto, el FGF-2 es un regulador crítico de la reparación neuronal. Miradas en torno a la importancia de FGF-2 después de una lesión cerebral proporcionan una estrategia para la comprensión de los mecanismos de reparación o regeneración del sistema nervioso central después de la exposición a toxinas, accidente cerebrovascular, convulsiones, o durante la enfermedades neurodegenerativas.

Respecto a las enfermedades neurodegenerativas, se ha visto que la formación de neuronas nuevas se encuentra regulada en éstas. En la EP, el potencial proliferativo se encuentra disminuido, así como el nivel de los factores que ayudan a la regeneración (Brinton et al., 2006). Se ha demostrado un incremento en la expresión del marcador de células inmaduras (Jin et al., 2006).

Cuando el estrés oxidativo es severo y prolongado, puede provocar una pérdida en la tasa de neurogénesis en el hipocampo. Se ha informado de la exposición crónica de los roedores a estrés oxidativo puede causar atrofia de las neuronas piramidales del hipocampo CA3 del hipocampo, (Govindarajan , 2006; Vyas et al., 2002) y disminuir los niveles de DA en el hipocampo y disminuir la actividad neurogénica (Rao et al., 2004; Srikumar et al., 2007) situaciones que podría ser similares en el grupo tratado con L-DOPA donde el sistema metabólico estaría incrementando la producción de radicales libres, es decir el sistema estaría con estrés oxidativo y eso explicaría el por qué en ambos hemisferios se encuentra disminuida la neurogénesis en este grupo .

Ahora bien, como se describe en nuestros resultados, los animales que recibieron tratamiento con melatonina presentaron un aumento en el número de neuronas BrdU/NeuN (Gráfica 3) a diferencia del grupo de 6-OHDA y los que recibieron el tratamiento con L-DOPA. La neuroprotección observada con el tratamiento con melatonina pudo deberse a que ésta actúa como atrapador de radicales libres y antioxidante, ya que tiene la capacidad de estimular las enzimas antioxidantes como el GSH y SOD proporcionando un ambiente favorable para la neurogénesis (Mayo et al., 2005).

Estudios recientes han demostrado que la melatonina aumenta la proliferación celular en el hipocampo de ratones adultos y en el cerebro medio de rata, y que también influye en la proliferación y diferenciación de las células embrionarias. Se ha comprobado que la pinealectomía provoca pérdida de neuronas piramidales del hipocampo en ratas y, que este efecto es revertido por la administración de melatonina (Sharma, 2007; Kong, 2008).

En cuanto a los grupos tratados con L-DOPA, la L-DOPA no protegió las alteraciones inducidas por la 6-OHDA. A este respecto se ha sugerido que el tratamiento con L-DOPA produce estrés oxidativo por dos vías: a) Incremento en la degradación de DA por la MAO generando H_2O_2 como un producto (Maratos et al., 2003), y b) por la autooxidación de la L-DOPA a DA, la cual resulta en la producción de H_2O_2 , $O^{\cdot -}$, OH y quinonas (Luo y Roth, 2000). Por lo que se ha propuesto que la pérdida neuronal puede ser causada por mecanismos de oxidación, lo que podría estar frenando la neurogénesis en el hipocampo, ya que existe una amplia evidencia de que la L-DOPA reduce la supervivencia de las células dopaminérgicas en cultivo (Michel y Heftil, 1990; Walkinshaw y Waters, 1995). La acción de la DA en estos sitios refuerza las acciones estriatales, además de regular el nivel de actividad cortical a través de dos familias de los receptores dopaminérgicos, los D1 estimula la actividad cortical por desinhibición, en tanto que los D2 la refuerza bloqueando la actividad de los circuitos inhibitorios (Penney, 1983). Existe un incremento de la supersensibilidad funcional producida por la denervación o muerte de las neuronas.

Este fenómeno está claramente asociado a la sobreactividad de receptores D1 (Gerfen, 2002; Chartoff, 2001). Esto quiere decir que la terapia de L-DOPA aumenta aun más el proceso de supersensibilidad que la muerte neuronal inicio. Los efectos de la administración de L-DOPA son atribuidos a la activación directa de los receptores D1 y D2 (Gerfen, 1990; Aubert, 2005).

CONCLUSIÓN:

- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc disminuye los niveles de neurogénesis en el giro dentado.
Y siendo que el GD esta implicado en los procesos de memoria, los cuales están afectados en gran proporción de pacientes con la EP; es decir la perdida de dopamina, que es el distintivo de esta enfermedad, afecta sistemas remotos no exclusivamente relacionados con el sistema motor.
- ❖ La L-DOPA, la melatonina y la coadministración de L-DOPA/melatonina favorecen la neurogénesis en el GD de animales con depleción dopaminérgica.
En el caso de la L-DOPA es obvio que la estimulación de los receptores dopaminérgicos regresa a sus niveles basales la tasa de neurogenesis. En cuanto a la melatonina, este fármaco es capaz de barrer las ROS y con ello disminuir el daño en el sistema, favoreciendo la supervivencia de nuevas células. Tal vez a largo plazo seria apropiado emplear ambos fármacos en el tratamiento de la EP. También valdría la pena diseñar experimentos encausados a la evaluación de la memoria.
- ❖ En la Zona subvectorial no hay diferencias significativas en el número de células proliferantes en ningún grupo. Solo hay una ligera tendencia al aumento en el número de dichas células ante la lesión, que parece ser revertido por la administración de L-DOPA o Melatonina.

ANEXOS

PERFUSIÓN PARA UNA RATA (200 mililitros)

SOLUCIÓN A:

BUFFER PBS:

SUSTANCIA	CANTIDAD
AGUA DESTILADA	150 ml.
FOSFATO MONOBASICO	0.612 ml.
FOSFATO DIBASICO	3.534 ml.
CLORURO DE SODIO	0.208 ml.

SE SACAN 50 ml DEL BUFFER Y SE LLEVAN A 100 ml PARA QUE QUEDE SOLUCIÓN DE 0.1 M (Se va a usar para los lavados en inmunohistoquímica)

SOLUCIÓN B:

PARAFORMALDEHÍDO Y GLUTARALDEHÍDO:

100 ml DE AGUA DESTILADA: SE CALIENTA A 50 °C
SE AGREGAN 4 g DE PARAFORMALDEHÍDO
SE AGREGAN 2 O 3 HOJUELAS DE HIDROXIDO DE SODIO
YA QUE ESTÁ MEZCLADO Y TRANSPARENTE SE ENFRIA HASTA 24 °C
Y YA FRÍO SE LE AGREGAN 8 ml DE GLUTARALDEHÍDO AL 50%

Se mezcla la solución A + solución B

Solución final: 0.1M Ph 7.4

SOLUCIÓN C:

SOLUCIÓN SALINA AL 9%: En 100 ml de agua destilada agregar 0.9 gramos de cloruro de sodio y mezclar.

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA BrdU

Cortar Tejido

Equilibrar temperatura de la muestra y navaja en criostato a -20 C por 20 min.

Realizar cortes de 50 µm.

Guardar hasta 6 cortes por pozo con 1ml de PB 0.1M (varia según tamaño de tejido y del pozo).

Preparar Muestra

Incubar 10 minutos en PB 0.1 M + Tritón 0.3% + H₂O₂ 3% en oscuridad.

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M + Tritón 0.3%.

Incubar 2 horas a 65 °C en formamida 50% en SSC 2X.

Hacer un lavado de 5 minutos con SSC 2X.

Incubar 30 minutos a 37 °C en HCl 1N.

Incubar 10 minutos en Borato de Sodio 0.1 M.

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M + Tritón 0.3%.

Incubar anticuerpo primario

Incubar de 12 a 16 horas en anticuerpo primario contra BrdU levantado en ratón 1:500 en solución de bloqueo; (Al día siguiente).

Incubar anticuerpo secundario

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M + Tritón 0.3%.

Incubar 2 horas en anticuerpo secundario contra IgG de ratón 1:500 en solución de bloqueo.

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M + Tritón 0.3%

Incubar 90 minutos en solución A + B.

Revelado

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M + Tritón 0.3%.

Incubar 3 minutos en DAB 0.5mg/ml + H₂O₂ y Niquel.

Detener la reacción con PB 0.1 M.

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA NeuN

Preparar Muestra

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M

Incubar 30 minutos en PB 0.1 M + H₂O₂ 3% + Metanol al 10%.

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M.

Incubar una hora en PB 0.1 M + Tritón 0.3% + 30 µ de suero normal de caballo.

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M.

Incubar anticuerpo primario

Incubar 2 días en anticuerpo primario contra NeuN levantado en ratón 1:500 en solución de bloqueo.

Incubar anticuerpo secundario

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1

Incubar 2 horas en anticuerpo secundario contra IgG de ratón 1:200 en solución de bloqueo.

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M.

Incubar 90 minutos en solución A + B.

Revelado

Hacer 3 lavados de 10 minutos con PB 0.1 M.

Incubar 3 minutos en DAB 0.5mg/ml + H₂O₂.

Detener la reacción con PB 0.1 M.

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA PARA TH.

Los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron vía intracardiaca con una bomba peristáltica pasando 50 ml de solución salina al 9% y posteriormente 150 ml de paraformaldehído (4% en buffer fosfatos salina PBS-, 0.1 M, P.H. 7.4). Se extrajeron los cerebros y se colocaron primero en el mismo fijador durante 2 hrs y luego en PBS con sacarosa al 30% durante 12 hrs. Con la ayuda de un criostato se realizaron cortes coronales de 50 μ m para ser sometidos a la técnica de inmunocitoquímica anti-TH. El proceso de inmunotinción se efectuó por flotación y consistió en los siguientes pasos: los cortes se lavaron en buffer PBS durante 3 periodos de 10 min cada uno. Después se colocaron durante 30 min en PBS conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.3% y metanol al 10%, para inactivar la peroxidasa endógena.

Posteriormente se lavaron en PBS durante 3 periodos de 10 min cada uno, para después colocarlos durante una hora en PBS conteniendo 3% de suero normal de caballo (SNcb) y 0.3% de tritón X-100. Se efectuó por 48 hrs a 4 °C la incubación con el anticuerpo primario anti-TH, policlonal hecho en conejo (Chemicon International; Temecula, CA, EUA), diluido 1:1000 con PBS conteniendo 3% de SNcb. Pasando el tiempo establecido, los cortes se sumergieron en PBS conteniendo 1% de SNcb durante 3 periodos de 10 min cada uno, para después incubarse durante dos horas a temperatura ambiente con IgG de conejo (Vector Laboratories; Burlingame, CA, EUA) diluido 1:200 en PBS conteniendo 1% de SNcb. Los cortes fueron sometidos a 3 periodos de lavados de 10 min cada uno, en PBS.

Durante las siguientes dos horas, los cortes permanecieron incubándose, a temperatura ambiente, con el complejo Avidina-Biotina (Vector) a una concentración de 0.1% en PBS. Al cumplirse el periodo de incubación, los cortes se lavaron y se colocaron en una solución de diaminobenzidina (Sigma) diluida 1:2000 en PBS para revelar la inmunoreacción.

Una vez revelada la inmunoreacción, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar y se cubrieron con resina.

Soluciones

Solución A (2L)

NaH₂PO₄ 48 gr.
Agua MilliQ 2 L

Solución B (2L)

NaHPO₄ 56.8 gr.
Agua MilliQ 2 L

Buffer de fosfatos (PB) 0.1 M (1L) pH 7.4

Solución A 95 ml
Solución B 405 ml
Agua MilliQ 500 ml

PB 0.1 M + Tritón 0.3% (500ml)

PB 0.1 M 498.5 ml
Tritón X-100 1.5 ml

PB 0.1 M + Tritón 0.3% + H₂O₂ 3% (15ml)

PB 0.1 M + Tritón 0.3% 13.5 ml
H₂O₂ 30% 1.5 ml

SSC 20X (100ml) pH 7 Filtrar

NaCl 17.5 gr.
Citrato de Sodio 8.8 gr.
Agua MiliQ 100 ml

SSC 2X (20ml)

Agua MiliQ 18 ml
SSC 20X 2 ml

Formamida 50% en SSC 2X (15ml)

SSC 2X 7.5 ml
Formamida 7.5 ml

HCl 2N (50ml)

Agua MiliQ 41.8 ml
HCl 37.5 % (p/p) 8.2ml

HCl 1N (15ml)

Agua miliQ 7.5 ml
HCl 2N 7.5 ml

Borato de Sodio 0.1M (100ml) pH 8.5

Borato de Sodio 3.81gr.
Agua MiliQ 100 ml

A+B (10 ml)

Reactivo A	25µl
Reactivo B	25µl
PB 0.1M+Tritón 0.3%	9.95 ml

Solución de Bloqueo I (20ml)

Suero de caballo	1 ml
PB 0.1M+Tritón 0.3%	19 ml

Solución de Bloqueo II (100ml)

Albumina	3 gr.
PB 0.1 M	90 ml

Filtrar

Azida de sodio (antimicótico)	0.025 gr.
Tritón X-100	100µl

Aforar a 100ml con PB.

Guardar a 4°C

DAB

1gota de reactivo del KIT por cada 2.5 ml de solución.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Abrous D.N., Adriani W., Montaron M.F., Aurousseau C., Rougon G., Le Moal M., Piazza P.V. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J. Neurosci.*, 22(9):3656-3662.

Adams J. R., Van Netten H., Schulzer M., Mak E., McKenzie J., Strongosky A., Gasser T. (2004). PET in LRRK2 mutations: comparison to sporadic Parkinson's disease and evidence for presymptomatic compensation. *Brain*, 128(12), 2777-2785.

Adler C. H., Ahlskog J. E. (2000). *Parkinson's disease and movement disorders: diagnosis and treatment guidelines for the practicing physician*. Springer Science Business Media.

Agid Y. (1998). Levodopa: is toxicity a myth. *Neurology*; 50: 858-63.

Akbulut K. G., Gonül B., Akbulut H. (2008). Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain research*, 1238, 31-35.

Altman J., Bayer S.A. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *The Journal of Comparative. Neurology*, 301:343-364.

Altman J., Das G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.*, 124:319- 336.

Álvarez-Buylla A., Lim D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41:683–686.

Amaral D.G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neur.*, 182:851-914.

Amaral D.G., Witter M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.

Ambrogini P., Orsini L., Mancini C., Ferri P., Ciaroni S. (2004). Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience. Lett.* 359: 13–16.

Aubert I., Guigoni C., Håkansson K., Li Q., Dovero S., Barthe N. & Bezard E. (2005). Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa- induced dyskinesia. *Annals of neurology*, 57(1), 17-26.

Auladell C., Martinez A., Alcantara S., Supi, H., Soriano E. (1995). Migrating neurons in the developing cerebral cortex of the mouse send callosal axons. *Neuroscience*, 64 (4): 1091-1103.

Ávila C. M. R., Gutiérrez V. A. L., Ordoñez L. J. L., Colín B. L., Espinosa V. J., Aley M. P., Montiel F. E., Anaya M. V., Juárez S. M. L., Machado S. J. P. (2006). Time course changes of the striatum neuropil after dopamine depletion and the usefulness of the

contralateral striatum as a control structure: a Parkinson's disease experimental model. *Neurological Research*. 30: 1068-1074.

B

Bai F., Bergeron M., Nelson D.L. (2003). Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 44:1013-1021.

Baker S.A., Baker K.A., Hagg T. (2004). Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *European Journal of Neuroscience*, 20(2), 575-579.

Baker S.A., Baker K.A., Hagg T., (2004). Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* 20, 575–579.

Balu D.T., Easton R.M., Birnbaum M.J., Lucki I. (2008). Deletion of Akt isoforms reduce hippocampal neurogenesis, fear conditioning and antidepressant behavioural responses. Vol.157.11. Society for Neuroscience, Washington, D.C.

Banasr M., Hery M., Brezun J.M., Daszuta A. (2001). Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 14(9):1417-1424.

Banasr M., Hery M., Printemps R., Daszuta A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*, 29:450-460.

Benetello P. Furlanut M. Zara G. (1993). Plasma levels of levodopa and its main metabolites in parkinsonian patients after conventional and controlled-release levodopa-carbidopa associations. *Eur Neurol*; 33: 69 -73

Benitez-King G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 40: 1–9.

Birkmayer W. Hornykiewicz O. (2001). The effect of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (= DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Wien Klin Wochenschr*; 15: 851-4

Bizon J.L., Han J.S., Hudon C., Gallagher M. (2003). Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze. *Hippocampus* 13: 676–684.

Bizon J.L., Gallagher M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur. J. Neurosci.*, 18 (1):215-219.

Björklund A., Steveni U. (1979). Reconstruction of the nigro-striatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res*; 177:555-560.

Blackstad T.W., Brink K., Hem J., Jeune B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 138:433-450.

Bondy S.C., Sharman E.H. Melatonin and the aging brain. (2007) *Neurochemistry International*. I (Vol 50): 571–580.

Bordet R., Devos D., Brique S., Touitou Y., Guieu J. D., Libersa C., Destee A. (2003). Study of circadian melatonin secretion pattern at different stages of Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology*, 26(2), 65-72.

Borta A., Höglinger G.U. (2007). Dopamine and adult neurogenesis. *Journal of neurochemistry*, 100(3), 587-595.

Boutin J.A., Audinot V., Ferry G. (2005). Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacological Sciences*. 26(8):412-419.

Brezun, J.M., Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, 89:999-1002.

Briton-Jones C., Lok I.H., Po A.L.S., Cheung C.K., Chiu T.T., Haines C. (2006). Changes in the ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expression and their cellular localization throughout the ovulatory cycle in the human oviduct. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 23(3), 149-156.

Bruel-Jungerman E., Laroche S., Rampon C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.*, 21:513–521.

Bubenik G. A. (2002). Review: gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive diseases and sciences*, 47(10), 2336-2348.

Bursztajn S., Falls W.A., Berman, S.A., Friedman M.J. (2007). Cell proliferation in the brains of NMDAR NR1 transgenic mice. *Brain. Res.* 1172:10-20.

C

Cameron H.A., McKay R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 435:406–417.

Cardinali D.P., Nagle C.A., Freire F., Rosner J.M. (1975). Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 18(1), 72-85.

Cardozo-Pelaez F., Brooks P. J., Stedeford T., Song S., Sanchez-Ramos J. (2000). DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 779-785.

Carlberg C. (2000). Gene regulation by melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 387-396.

Carlsson A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev*; 11:490-493.

Carocci A., Sinicropi M. S., Catalano A., Lauria G., Genchi G. (2014). Melatonin in Parkinson's Disease. *A Synopsis of Parkinson's Disease*. Intech.

Caviness V.S. Jr., Takahashi T., Nowaskowski R.S. (2000). Neuronogenesis and the early events of neocortical histogenesis. *Results Probl Cell Differ.*, 30:107-143.

Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3), 527-605.

Chartoff E.H., Marck B.T., Matsumoto A.M., Dorsa D.M., Palmiter R.D. (2001). Induction of stereotypy in dopaminodeficient mice requires striatal D1 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98:10451-6.

Chase T.N. (1998). The significance of continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs*; 55 Suppl 1: 1-9

Chicurel M.E., Harris K.M. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and the irsynaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 325(2):169-182.

Chouza C. Romero S. Gomensoro J.B. (1976). Long-term syndrome in the treatment of Parkinsonism with L-dopa and decarboxylase an inhibitor. *Neurol Neurocir Psiquiatr*; 17: 255-68

Clarke C.E. Sambrook M.A. Mitchell I.J. Crossman A.R. (1987). Levodopa induced Dyskinesia and response fluctuations in primates rendered parkinsonian with 1-methyl-4 phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *J Neurol Sci*; 78: 273-280.

Colzi A. Turner K. Lees A.J. (1998). Continuous subcutaneous waking day apomorphine in the long term treatment of levodopa induced interdose dyskinesias in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. May;64(5):573-6.

Coronas V., Bantubungi K., Fombonne J., Krantic S., Schiffmann S. N., Roger M. (2004). Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the postnatal subventricular zone. *Journal of neurochemistry*, 91(6), 1292-1301.

Cotzias G.C., Van Woert M.H., Schiffer L.M. (1967). Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism. *N Engl J Med*; 276:374-379.

D

Daniel J.M., Fader A.J., Spencer A.L., Dohanich G.P. (1994). Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm. Behav.*, 32:217–225.

Dawirs R.R., Hildebrandt K., Teuchert-Noodt G. (1998). Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J. Neural Transm.* 105, 317–327.

Debeir T., Ginesteta L., Francois C., Laurens S., Martel J. C., Chopin P., Marien M., Colpaert F., Raisman-Vozari R. (2005). Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental Neurology.* (193):444– 454. 2005.

DeLong M.R. Crutcher M.D. Georgopoulos A.P. (1983). Relations between movement and single cell discharge in the substantia nigra of the behaving monkey. *J Neurosci*; 3: 1599-1606.

Diaz J., Ridray S., Mignon V., Griffon N., Schwartz J. C., Sokoloff P. (1997). Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* (Vol 17) (No11):4282–92.

Dickinson D. A., Forman H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64 (5), 1019-1026.

Döbrössy M.D.E., Aourousseau C., Le Moal M., Piazza P.V., Abrous D.N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: Learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol. Psychiatry*, 8: 974–982.

Drapeau E., Mayo W., Aourousseau C., Le Moal M., Piazza P.V. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:14385– 14390.

Drucker-Colín R., Verdugo-Díaz L. (2004). Cell transplantation for Parkinson's Disease: Present Status. *Cellular and Molecular Neurobiology*; 24: 301-316.

Dubocovich M.L. (2010). Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med* 8Suppl(3): 34–42.

Duman R.S., Malberg J., Nakagawa S. (2001). Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299:401–407.

Duman R.S., Monteggia L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, 59:1116-1127.

Dunlop S., Steeves, J. (2003). Neural activity and facilitated recovery by training after CNS injury: implications for rehabilitation. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, 8(4), 92-103.

Dupret D., Montaron M.F., Drapeau E., Auroseau C., LeMoal M., Piazza P.V., Abrous D.N. (2005). Methylazoxymethanol acetate does not fully block cell genesis in the young and aged dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 22:778–783.

Dusek J.A., Eichenbaum H. (1997). The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 24; 94(13):7109-14.

E

Eisch A.J. (2002). Adult neurogenesis: implications for psychiatry. *Prog. Brain. Res.*, 138:315–342.

Encinas J.M., Vaahtokari A., Enikolopov G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:8233-8238.

Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn AM., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med*; 4: 1313–17.

Escames G., López A., García J. A., García L., Acuña-Castroviejo D., García J. J., López L. C. (2010). The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Current neuropharmacology*, 8(3), 182.

F

Fahn S. (2002). Parkinson's Study Group. Results of the ELLDOPA (Earlier vs. Later Levodopa) study. *Mov Disord*; 17(Suppl): 13-14.

Fahn S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:1-14.

Feldman R.S., Meyer J.S., Quenzer L.F. (1997). *Principles of neuropsychopharmacology*. Sunderland, Sinauer : 277-344.

Freund T.F., Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6:347-470.

Freundlieb N., Francois C., Tande D., Oertel W.H., Hirsch E.C., Hoglinger G.U. (2006). Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J. Neurosci.* 26, 2321–2325.

Frielingsdorf H., Thal L.J., Pizzo D.P. (2006) The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris wáter maze. *Behav Brain Res* Mar 15; 168(1):37-46.

G

Gaarskjaer F.B. (1978). Organization of mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 178:73-88.

Galano A., Tan D.X., Reiter R.J., (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: aphysicochemical examination. *J. Pineal Res.* 51, 1-16.

Gasbarri A., Sulli A., Packard MG.(1997). The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21, 1–22.

Gasbarri A., Verney C., Innocenzi R., Campana E., Pacitti C. (1994). Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res.* 668, 71–79.

Ge S., Goh L., Sailor K.A., Kitabatake Y., Ming G.L., Song H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439:589-593.

Gerfen C.R., Engber TM., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F., D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptorregulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*; 250:1429-32.}

Gerfen C.R, Miyachi S., Paletzki R., Brown P. (2002). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopaminedepleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase *J Neurosci*; 22:5042-54.

Gil D. M., Rebelo M.J. (2010). Evaluating the antioxidant capacity of wines: a laccase-based biosensor approach. *European Food Research and Technology*, 231(2), 303-308.

Glinka Y., Tipton K.F., Youdim M.B.H. (1998). Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex 1 by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur. J. Pharmacol.*(35): 121-129.

Gould E. Tanapat P., McEwen B.S., Flugge C., Fuchs E. (1998). Proliferation of granule cell precursor in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.*, 95:3168-3171.

Gould E., Reeves A.J., Graziano M.S., Gross C.G. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science.*; 286:548-52.

Gould E., Tanapat P. (1997). Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience*, 80:427-436.

Govindarajan A., Kelleher R. J., Tonegawa S. (2006). A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 575-583.

Grace A. A. (1991). Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*;41:1-24.

Groen T., Wyss J.M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.*, 302(3):515-528.

Guillin O., Diaz, J., Carroll P., Griffon N., Schwartz J. C., Sokoloff, P.(2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*(No 6833):86–9.2001.

Guillin O., Griffon N., Bezard E., Leriche L., Diaz, J., Gross C., Sokoloff. (2003). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: therapeutic implications in Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology* (No480):89–95.

Gutierrez V. (2007). Comparación del Efecto de Diferentes Fármacos en un modelo animal de la Enfermedad de Parkinson. (Tesis para Obtener el Grado de Maestría). Tlanepantla Edo. de México. FES-Iztacala UNAM.

Gutiérrez V.A.L., Anaya M.V., Ordoñez L. J. L., García R.R., Torres E.C., Rivera M.M., Sánchez B.J., Montiel F.E., Avila C.M.R (2012). Effect of Chronic L-Dopa or Melatonin Treatments after Dopamine Deafferentation in Rats: Dyskinesia, Motor Performance, and Cytological Analysis. *International Scholarly Research Network*: 1- 16.

Gutiérrez V.A. (2004). Efecto de la L-DOPA en el estriado y Sustancia nigra de rata lesionada con 6-OHDA: Modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de Biólogo. ENEP-Estacara .UNAM.

Gutteridge J.M., Halliwell B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications*, 393(4), 561-564.

H

Harada T., Arii S., Mise M., Imamura T., Higashitsuji H., Furutani M., Sato H. (1998). Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene is overexpressed in highly invasive hepatocellular carcinomas. *Journal of hepatology*, 28(2), 231-239.

Hardeland R., Pandi-Perumal S.R. (2008) Melatonin, a potent agent in antioxidative

Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V., Spence D.W., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R. (2011). Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in neurobiology*, 93(3), 350-384.

Harms C., Lautenschlager M., Bergk A., Freyer D., Weih M., Dirnagl U., Weber J. R., Hortnagl H. (2000). Melatonin is protective in necrotic but not in caspase dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures. *FASEB J.* (Vol14):1814–1824.

Hastings N.B., Gould E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 413:146-154.

Hastings N.B., Tanapat P., Gould E. (2001). Neurogenesis in the adult mammalian brain. *Clinical Neuroscience Research*, 1:175-182.

Hatten M. E. y Mason C. A. (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*, 46(9):907-916.

Hefti F., Melamed E., Wurtman R.J. (1980). Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* (195)(1):123-137.

Högltinge G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.H., Caille I., Hirsch E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.*, 7(7):726-735.

Hornykiewicz O. (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* (2):925-64. Jun 18.

Hornykiewicz O. (2001). Parkinson Disease. *Encyclopedia of life sciences*; 1-10.

Howells D. W., Porritt M. J., Wong J.Y.F., Batchelor P.E., Kalnins R., Hughes A.J., Donnan G.A.(2000). Reduced BDNF mRNA Expression in the Parkinson's Disease Substantia Nigra. *Experimental Neurology.* (No 166):127-135.

Hughes A.J. Bishop S. Kleedorfer B. I. (1993). Subcutaneous apomorphine in Parkinson's disease: response to chronic administration for up to five years. *Mov Disord*; 8: 165-170.

I

Ivins J.K. y Pittman R.N. (1989). Growth cone-growth cone interactions in cultures of rat sympathetic neurons. *Dev Biol.*, 135(1):147-157.

Izquierdo I., Medina J.H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of learning and memory*, 63(1), 19-32.

J

Jay T. M., Glowinski J., Thierry A.M. (1989). Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.*, 505(2):337-340.

Jenner P.G. (1998). Brin M. F. Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. *Neurology* ; 50: S39-43; discussion S44-8.

Jessberger S., Zhao C., Toni N., Clemenson J. G. D., Li, Y., Gage F. H. (2007). Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labelling. *J. Neurosci.*, 27:9400-9407.

Jin K., Wang X., Xie, L., Mao X. O., Zhu W., Wang Y. Greenberg D. A. (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13198-13202.

Jolkkonen J. P. Jenner P. Marsden C. D. (1995). L-dopa reverses altered gene expression of substance P but not enkephalin in the caudateputamen of common marmosets treated with MPTP. *Brain Res Mol Brain Res*; 32: 297-307.

K

Kaplan M.S., Bell D.H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J. Neurosci.*, 4:1429-1441.

Kee N., Sivalingam S., Boonstra R., Wojtowicz J. M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Meth.*, 115:97–105.

Kempermann G., Krebs J., Fabel K. (2008). The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Curr Opin Psychiatry (No21)*: 290–295.

Kesner R.P. (2007) Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn.Mem. (Vol 14)*: 771–781.

Khaldy H., Escames G., León J., Bikdaouene L., Acuña C. (2003). Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiology of Aging. (Vol 24)*:491-500.

Kim M. J., Kim H. K., Kim B. S., Yim S. V. (2004). Melatonin increases cell proliferation in the dentate gyrus of maternally separated rats. *J Pineal Res (No37)*:193–197..

Kippin T. E., Kapur S., Van Der Kooy D., (2005). Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J. Neurosci.* 25, 5815–5823.

Kong X., Li X., Cai Z., Yang N., Liu Y., Shu J. (2008). Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol* : 569–579..

Kozorovitskiy Y., Gould E. (2003). Adult neurogenesis: a mechanism for brain repair?. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, 25(5):721-732.

Kronenberg G., Reuter K., Streiner B., Brandt M. D., Jessberger S., Yamaguchi M., Kempermann G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.*, 467:455-463.

Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G., Thal L. J., Gage F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.*, 17(15):5820–5829.

L

Lang A.E., Obeso J.A.,(2004). Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol.* 3, 309–316.

Langeveld C.H. Jongenelen C.A. Schepens E., (1995). Cultured rat striatal and cortical astrocytes protect mesencephalic dopaminergic neurons against hydrogen peroxide toxicity independent of their effect on neuronal development. *Neurosci Lett*; 192: 13-16.

Langston J.W., Irwin I., Ricaurte G.A. (1987). Neurotoxins, Parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*; 32: 19-49.

Larson, J., Jessen, R.E., Uz, T., Arslan, A.D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., Manev, H. (2006). Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT 2 receptor-deficient mice. *Neuroscience letters*, 393(1), 23-26.

Lemaire V., Koehl M., Le Moal M., Abrous D.N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 11032–11037.

León J., Acuña- Castroviejo D., Sainz R., Mayo J. C., Tan Dun-Xian., Reiter R. I J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Science* 75; 765-790.

Leuner B., Mendolia-Loffredo S., Shors T.J. (2004). High levels of estrogen enhance associative memory formation in ovariectomized females. *Psychoneuroendocrinology*, 29:883–890.

Leu Semenescu S., Arnulf I., Decaix C., Moussa F., Clot F., Boniol C., Roze E. (2010). Sleep and rhythm consequences of a genetically induced loss of serotonin. *Sleep*, 33(3), 307.

Lewis S.J.G., Salvos A., Robbins T.W. (2005). Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*: (43):23-32.

Liggins J., Pihl R. O., Benkelfat C., Leyton M. (2012). The dopamine augmenter L-DOPA does not affect positive mood in healthy human volunteers. *PLoS One*, 7(1), e28370.

Lindvall O., Bjorklund A., (1978) Anatomy of dopaminergic neuron systems in the rat brain. In P.J. Roberts, G.N. Woodruff and L.L. Iversen (Eds.), *Advances in Biochemical Pharmacology*, Vol. 19, Raven Press, New York, pp. 1-23.

Lisman J.E. (1999) Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* (22):233–242.

Lozano A.M., Lang E.A., Hutchison W.D., Dostrovsky J.D. (1998). New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and in its treatment. *Curr Opin Neurobiol*; 8: 783-790.

Lucas, G., Rymar, V.V., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., manta, S., Lambas-Senas, L., Wiborg, O., Haddjeri, N., Pineyro, G, Sadikot, A.F., Debonnel, G. (2007). Serotonin (4) (5-HT (4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55:712-725.

Luine V.N., Richards S.T., Wu V.Y., Beck, K.D. (1998). Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm. Behav*, 34:149–162.

Luo Y., Roth G. S. (2000). The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2(3), 449-460.

M

Macias M, Rodriguez-Cabezas MN, Reiter RJ, (2003)l. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* ; 27: 86-94.

Maharaj H., Maharaj S. D., Scheepers M., Mokokong R., Dada S. (2005). L-DOPA administration enhances 6-hydroxydopamine generation. *Brain Research*. 1063:180-186.

Malberg J. E., Eisch A. J., Nestler E. J., & Duman R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20(24), 9104-9110.

Maratos E. C., Jackson M. J., Pearce R. K., Cannizzaro C., Jenner P. (2003). Both short- and long-acting D-1/D-2 dopamine agonists induce less dyskinesia than L-DOPA in the MPTP-lesioned common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Experimental neurology*, 179(1), 90-102.

Markowska Dubocovich M. L. M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27(2), 101-110.

Marsden C. D. Parkes J. D. (1977) Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Lancet* ;12: 345-9

- Mates J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1), 83-104.
- Matthews D.B., Silvers J.R. (2004). The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 82:299–308.
- Mayo J.C., Sainz R.M., Tan D.X., Antolín I., Rodríguez C., Reiter R. J. (2005). Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine*, 27(2), 169-178.
- Mayoral J. (2008) Efecto de la L-Dopa y del a Melatonina en la conducta motora de ratas lesionadas con 6-OHDA: Modelo de la Enfermedad de Parkinson. (Tesis para obtener el título de Licenciado en Psicología).. Fes-Iztacala UNAM.
- McEwen B.S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22:105–122.
- Miller R., Beninger R. J. (1991) On the interpretation of as asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonista in animals with unilateral depletion of striatal dopamine. *Progress in Neurobiology*. (36): 229-256.
- Ming G., Song H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28:223–250.
- Mirescu C., Gould E. (2004). From neurotoxin to neurotrophin. *Nat. Neurosci.*, 7(9):899-900.
- Mogulkoc R., Baltaci A.K., Oztekin E., Aydin L., Sivrikaya A. (2006). Melatonin prevents oxidant damage in various tissues of rats with hyperthyroidism. *Life sciences*, 79(3), 311-315.
- Mones R.J., Elizan T.S., Siegel G.J. (1970) Analysis of L-dopa-induced dyskinesias in 152 cases of Parkinson's disease. *Neurology*. (4):405-6.
- Morish P.K. (2003) How Valid Is Dopamine Transporter Imaging as a Surrogate Marker in Research Trials in Parkinson's Disease. *Mov Disord*; 18 (Suppl 7): S63-70
- Moriya T., Horie N., Mitome M., Shinohara K. (2007). Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* :411–418.
- Mouradian M.M. (2002) Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 2002;58:179-185
- Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.*,116:201-211.
- Muller R.U, Stead M., Pach J. (1996). The hippocampus as a cognitive graph. *J Gen PhysiolJun*; 107(6):663-94. Review.

Musshoff U., Riewenherm D., Berger, E., Fauteck J.D., Speckmann E. J. (2002). Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus*, 12(2), 165-173.

Mytilineou C. Walker R.H. (2003). JnoBaptiste R. Olanow CW. Levodopa is toxic to dopamine neurons in an in vitro but not an in vivo model of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*; 304: 792-800

N

Nixon K., Crews F.T. (2002). Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 83:1087–1093.

Nosjeno Ferro M., Coge F., (2000). Identification of the melatonin bonding site MT3 as the quinone reductase2. *J Biol Chem.*;275:31311-17

O

Ohnuma S., Harris W.A. (2003). Neurogenesis and the Cell Cycle. *Neuron*, 40:199–208.

O'Keefe J., Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford: Clarendon Press., 570:614 .

Oleskevich S., Descarries L., Watkins K.C., Seguela P., Daszuta A. (1991). Ultrastructural features of serotonin innervations in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience*, 42:777-791.

Otero L., Zurita M., Bonilla C., Aguayo C., Rico M., Vaquero J. (2010). Intralesional administration of allogenic bone marrow stromal cells reduces functional deficits after intracerebral hemorrhage. *Histol Histopatol.*; 25:453-61.

Otero L., Zurita M., Bonilla C., Rico MA., Aguayo C., Rodriguez A., I. (2012). Endogenous neurogenesis after intracerebral hemorrhage. *Histol Histopatol.*;27: 303–15.

Öztürk G., Akbulut K G., Güney Ş., Acuna-Castroviejo,D. (2012). Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. *Experimental gerontology*, 47(9), 706-711.

P

Pan T., Xie W., Jankovic J., Le W. (2005). Biological effects of pramipexole on dopaminergic neuron-associated genes: relevance to neuroprotection. *Neurosci Lett* 29; 377; 106-9

Pandi Perumal S., Srinivasan V., Maestroni G. J. M., Cardinali D., Poeggeler B., Hardeland R., Melatonin. (2006). Nature's most versatile biological signal. *FEBS J*;273:2813-38.

Papez J.W. (1937) A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; Winter; 7 (1):103-12.

Parent .M., Yu TW., Leibowitz R.T., Geschwind DH., Sloviter RS., Lowenstein DH. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 17:3727-3738.

Parent M.B., Baxter MG. (2004). Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* Jan-Feb; 11(1):9-20.

Park J H., Enikolopov G. (2010). Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion, *Experimental Neurology*, (Vol. 222) (No. 2): 267–276.

Parkinson Study Group. (2002). Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA*; 287: 1653-1661.

Pearce RK, Jackson M, Smith L, et al., (1995). Chronic L-dopa administration induces dyskinesias in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- treated common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Mov Disord*; 10: 731-740.

Pencea V., Bingaman K.D., Freedman L.J., Luskin M.B. (2001). Neurogenesis in the Subventricular Zone and Rostral Migratory Stream of the Neonatal and Adult Primate Forebrain. *Experimental Neurology*, 172:1–16.

Peng J., Xie L., Jin K., Greenberg DA., Andersen JK., (2008). Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 153, 664–670.

Penney J.B., Young A.B. (1983). Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Annual review of neuroscience*, 6(1), 73-94.

Pentland B., Matthews D., Mawdsley C. (1982) Parkinson's disease: long-term results of levodopa therapy. *Scott Med J*; 27: 284-7.

Perry T.L., Yong V.W., Ito M. (1984) Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-dopa and carbidopa chronically. *J Neurochem*; 43: 990-993.

Peterson D.A. (2002). Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr. Op. Pharmacology*, 2:34–42.

R

Ramírez J., Ruiz S., Jiménez G., Ramírez V. J., Vargas F. E., Martha P. G. A. (2006) Polimorfismo -116c-g del gen α -sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson. Salud Pública de México. Vol. 48, No 004:289-290. julio – agosto.

Ramírez G., Silva-Lucero, M. D.C., Gómez-Virgilio L., Ocaña-Fernández, M. D.Á., Ortiz-López L., Torres-Pérez M O., Meraz-Ríos M A. (2013). Las zonas neurogénicas en el adulto y su relación con las enfermedades neuropsiquiátricas. Salud mental, 36 (3), 201-210.

Ramírez-Rodríguez., Gloria Benítez-King., Gerd Kempermann. (2007). Formación de Neuronas Nuevas en el Hipocampo adulto: Neurogénesis. Salud Mental, Vol. 30, No. 3, mayo-junio. México.

Rao MS., Shetty AK. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. Eur. J. Neurosci., 19:234-246.

Rao M.S., Shetty A.K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. Eur. J. Neurosci., 19:234-246.

Reiter R.J. (2000). Melatonin: Lowering the high price of free radicals. News Physiol. (No 15):246-250.

Reiter R.J., Tan D X., Acuña C., D., Burkhardt S K. (2000) Melatonin: mechanism and actions as an antioxidants Curr Top Biophys. (No24): 171-183.

Reiter R.J., (2003) Melatonin: clinical relevance, Best Pract: 273–285.

Reiter R.J; (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine Rev. 12, 151-180

Reyna V.P.E. (2012). “Evaluación del efecto del tratamiento con el agonista D3(7-OH-DPAT) asociado a la transfección del factor neurotrófico BDNF sobre las alteraciones motoras en un modelo de rata hemiparkinsoniana por 6-hidroxidopamina en el haz medial”. (Para obtener el grado de Maestra en Ciencias) Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

Richardson E.P., Adams R.D. (1982). Degenerative diseases of the nervous system. Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease. Harrison’s Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill: 2119-32. 1982.

Roig C.A. (2013). Estrategias antienvjecimiento y neurogénesis adulta. En Proceedings of defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. Safety, Health and Environment World Congress. p. 88-92.

S

Sahay A., Hen R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.*, 10:1110–1115.

Sakakibara S., Okano H. (1997). Expression of Neural RNA-Binding Proteins in the Postnatal CNS: Implications of Their Roles in Neuronal and Glial Cell Development. *The Salamanca G. F Journal of Neuroscience*, 17(21):8300–8312.

Salamanca G, F. (2004). Los genes y la enfermedad de Parkinson. *Biología molecular y medicina*. Vol. 140, No.4. 475-476.

Santín L. J., Rubio S., Begega A., Miranda R., Arias J. L. (2000). Aprendizaje espacial e hipocampo. *Rev Neurol*, 455-462.

Scatton B., Simon H., Le Moal M.B. (1980). Origin dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neuroscience Letters*, (No 18):125-131.

Scerri C., Stewart C.A., Breen K.C., Balfour D.J. (2005). The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology.*, 16:1–7.

Schapira A.H., Bezard E., Brotchie J., Calon F., Collingridge G.L., Ferger B., Hengerer B., Hirsch E., Jenner P., Le Novere N., Obeso J.A., Schwarzschild M.A., Spampinato U., Davidai G., (2006). Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 845–854.

Scharfman H.E. (2007). The CA3 “back projection” to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* (No 163): 627–637.

Scoville W.B., Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20, 11-21.

Segovia de Arana J.M., Mora T. F. (2002). Enfermedades neurodegenerativas. *Serie científica. Nutrition & Metabolism* 2:22, 1-15

Seithikurippu R., Pandi-Perumal, A. S., Brown, G. M., Spence, D. W., Bharti, V. K., Kaur, C. Cardinali, D. P. (2013). Melatonin antioxidative defense: therapeutic implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotoxicity research*, 23(3), 267-300.

Seri B., García-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. (2001). Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J. Neurosci.*, 21(18):7153–7160.

Seri B., García-Verdugo J.M., Collado-Morente L., McEwen B.S., Álvarez-Buylla A. (2004). Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 478:359–378.

Shafer R., Levant B. (1988). The D3 dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology*, (Vol 135)(No1):1–16.

Sharma S. V., Bell D W., Settleman J., Haber D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3), 169-181.

Shohamy D., Myers C. E., Grossman S., Sage J., Gluck M. A. (2005). The role of dopamine in cognitive sequence learning: Evidence from Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*,(156): 191-199.

Shors T.J., Miesegaes G., Beylin A., Zhao M., Rydel T. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372–376.

Simon H., Le Moal M., Galey D. Cardo B. (1976). Silver impregnation of dopaminergic systems after radiofrequency and 6-OHDA lesions of the rat ventral tegmentum, *Brain Res.*, 115 ,215-231.

Simonneaux V., Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharmacol.* (No 55):325-395.

Smith L. A., Jackson M. J., Al-Barghouthy G., Rose S., Kuoppamaki M., Olanow C. W., Jenner P. (2005). Multiple small doses of levodopa plus entacapone produce continuous dopaminergic stimulation and reduce dyskinesia induction in MPTP-treated drug-naive primates. *Mov Disord*; 20: 388.

Song H., Stevens CF., Gage FH. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature*, 5(5): 39-44.

Spain J. W., Newsom GC. (1991). Chronic opioids impair acquisition of both radial maze and Y-maze choice escape. *Psychopharmacology*, 105:101–106.

Srikumar B. N., Raju T R., Rao B. S. (2007). Contrasting effects of bromocriptine on learning of a partially baited radial arm maze task in the presence and absence of restraint stress. *Psychopharmacology*, 193(3), 363-374.

Swanson L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* 9, 321–353.

Swanson L. W., Cowan W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 172(1):49-84.

T

Takeda A., Kikuchi A., Matsuzaki-Kobayashi M., Sugeno N., Itoyama Y. (2007). Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*,254(4), IV2-IV7.

Tanapat P., Hastings N. B., Rydel T. A., Galea L. A., Gould E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J. Comp. Neurol.*, 437:496-504.

Tanapat P., Hastings N. B., Reeves A. J., Gould E. (2005). Ovarian Steroids Influence Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of the Adult Female Rat in a Dose- and Time-Dependent Manner. *J. Com. Neurol.*, 19(14):5792–5801.

Tashiro A., Sandler V. M., Toni N., Zhao C., Gage F. H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442:929-933

Teychenne P. F. Bergsrud D., Racy A., Elton R. L., Vern B. (1982) Bromocriptine: low-dose therapy in Parkinson disease. *Neurology*; 32: 577-83.

Than D. X., Reiter R. J., Manchester L. C., Yan M. T., El-Sawi M., Sainz R. M. (2010). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2: 181 197.

Torres E. (2012). Efecto funcional y sobrevivencia neuronal en la SNc por la coadministración de LDopa/ Melatonina en ratas lesionadas con 6-OHDA. Tesis de Licenciatura en Biología. FES Iztacala UNAM.

Tozuka Y., Fukuda S., Namba T., Seki T., Hisatsune T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47(6):803 815.

Tricoire H., Locatelli A., Chemineau P., Malpoux B. (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* ; 142: 84-90.

U

Ungersted U., Arbuthnott G. F. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* (24):485-493.

Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* Dec;5(1):107-10. 1968.

V

Vallone D., Picetti R. Borrelli E. (2000). Structure and function of dopamine receptor. *Neuroscience and Biobehavior Reviews*. 24, 125-132.

Van Kampen J. M., Robertson H. A. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *Eur. J. Neurosci.*, 19:2377-2387.

Van Praag H., Christie B. R., Sejnowski T. J., Gage F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *PNAS.*, 96 (23):13427-13431.

Van Praag H., Schinder A. F., Christie B. R., Toni N., Palmer T. D., Gage F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415:1030-1034.

Vaneck J. (1998). Cellular mechanism of melatonin action. *Physiol. Rev.* (No 78): 687–721.

Venero J. L., Beck K. D., Hefti F. (1994). 6-Hydroxydopamina lesions reduce BDNF mRNA levels in adult rat brain substantia nigra. *NeuroReport* (No 5):429-432.

Vernadakis A. y Mangoura D.A. (1988). Factors influencing glia growth in culture: nutrients and cell-secreted factors. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 259:57-79.

Verney C., Baulac M., Berger B., Alvarez C., Vigny A., Helle K.B., (1985). Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of Young and adult rat. *Neuroscience* 14, 1039–1052.

Vertes R.P. (1992). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 326(4):595-622.

Vivar C., Van Praag H. (2013). Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Frontiers in neural circuits*(Vol. 7): 1-13.

Vyas A., Mitra R., Rao B. S., Chattarji S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6810-6818.

W

Walkinshaw G., Watters C. (1995). Inducción of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest* 95,2458-2464.

Weil Z.M., Hotchkiss A.K., Gatién M.L. (2006). Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Research*. Volume68, Issue 6: 425-429.

Whone AL., Watts RL., Stoess AJ., Davis M., Reske S., Nahmias C. (2003). Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Ann Neurol*; 54:93-101.

Winner B., Geyer M., Couillard-Despres S., Aigner R., Bogdahn U., Aigner L., Winkler J. (2006). Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Experimental neurology*, 197(1), 113-121.

Winters B.D., Dunnett SB. (2004). Selective lesioning of the cholinergic septo-hippocampal pathway does not disrupt spatial short-term memory: a comparison with the effects of fimbria-fornix lesions. *Behav Neurosci* Jun; 118(3):546-62.

Wittmann B C., Schott B H., Guderian S., Frey J U., Heinze H J., Duzel, E. (2005). Reward-related FMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus dependent long-term memory formation. *Neuron* (Vol 45): 459–467.

Wood GE., Beylin AV., Shors TJ. (2001). The contribution of adrenal and reproductive hormones to the opposing effects of stress on trace conditioning in males versus females. *Behav. Neurosci.*, 115:175–187.

Wu M., Shanabrough M., Leranth C., Alreja M. (2000). Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J Neurosci*. May 15; 20(10):3900-3906.

X

Xu C., Datta S., Wu M., Alreja M. (2004). Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons. *Eur J Neurosci*. Apr; 19(8):2299-309.

Y

Yoshimura S., Takagi Y., Harada J., Teramoto T., Thomas S. S., Waeber, C. Moskowitz, M. A. (2001). FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5874-5879.

Z

Zhao C., Teng E.M., Summers R. G. Jr Ming G. L. y Gage F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.*, 26:3–11.

Zola-Morgan S., Squire L. (1991). Medial temporal lesions in monkeys impair memory in a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behavioral Neuroscience* 100: 165-170.