



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR EN UN
MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

MÉDICO CIRUJANO OSCAR ARIAS CARRIÓN

DIRECTOR DE TESIS

DR. RENÉ DRUCKER COLÍN

OCTUBRE DE 2006



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.

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO AL-201 DEL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA TUTORIA DEL DR. RENÉ DRUCKER-COLÍN.

CON EL APOYO ECONÓMICO DE:

CONACYT

BECA No. 176581 OTORGADA A O-AC
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN No. 25122-M OTORGADO A R.D.C.

DGEP

SUPLEMENTO DE BECA OTORGADA A O-AC

DGAPA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN IN-208799 OTORGADO A R.D.C.

FIDEICOMISO UNAM

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN OTORGADO A R.D.C.

IMPULSA-UNAM

PROYECTO DE INVESTIGACION OTORGADO AL GRUPO DE CÉLULAS TRONCALES

DEDICO ESTA TESIS:

A LA MUJER QUE MÁS AMO, MI MADRE ROSAURA ARIAS CARRIÓN. POR LLEVARME MÁS ALLÁ DE MIS SUEÑOS.

A MIS HERMANAS. TERESA, ROSA Y GLORIA. POR SU AMOR INCONDICIONAL.

A MIS SOBRINOS. SONIA, JAIME, VIOLETA, CINTHYA, LUPITA, IRLANDA, KARINA Y KARLA. POR LLENAR MI VIDA DE FELICIDAD.

A NANCY PANDO-AGUILAR. POR HACER DE MI VIDA ALGO ESPECTACULAR.

A MIS AMIGOS. EDUARDO GONZÁLEZ-BADILLO†, LUÍS CASTELLANOS-PÉREZ, FRANCISCO PÉREZ-EUGENIO, MARKO BARRERA-CRUZ, SERGIO SALGADO-LICONA Y FABIO GARCÍA-GARCÍA. POR COMPARTIR LOS MEJORES INSTANTES.

AGRADECIMIENTOS

- A MI TUTOR, EL DR. RENÉ DRUCKER-COLÍN. DURANTE ESTOS CUATRO AÑOS CON SU EJEMPLO Y APOYO HE ENCONTRADO UNA VIDA DIGNA DE VIVIRSE.
- A TERE TORRES, MARIA VALVERDE Y ALICIA MONDRAGÓN. POR SU TIEMPO, AMISTAD Y APOYO EN TODAS ESAS URGENCIAS ACADÉMICAS.
- AL DR. ANDRÉS GUTIÉRREZ. POR ENSEÑARME LO NECESARIO SOBRE LA TRANSFECCIÓN CON AdGFP.
- AL DR. ARTURO HERNÁNDEZ. POR ENSEÑARME LO BÁSICO SOBRE MICROSCOPIA CONFOCAL.
- AL DR. STEFAN MIHAILESCU. POR ENSEÑARME TODO LO NECESARIO PARA EL REGISTRO EN REBANADAS.
- AL DR. SALVADOR HERNÁNDEZ. POR SU ENORME APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE TODA LA ELECTROFISIOLOGÍA. SOBRE TODO POR SU AMISTAD.
- AL DR. JOSÉ BARGAS Y A LA DRA. ELVIRA GALÁRRAGA POR MOSTRARME LA TÉCNICA EMPLEADA EN LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA.
- A LA BIÓLOGA MARCELA PALOMERO-RIVERO. POR EL INVALUABLE APOYO TÉCNICO, COLABORACIÓN Y AMISTAD DURANTE TODOS ESTOS AÑOS EN EL LABORATORIO.
- A LA BIÓLOGA DIANA MILLÁN-ALDACO. POR EL APOYO EN LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS REALIZADAS DURANTE ESTE TRABAJO.
- A VERÓNICA RODRÍGUEZ Y FEDERICO JANDETE-GARCÍA. POR EL APOYO OTORGADO EN LAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.
- A FRANCISCO PÉREZ-EUGENIO. POR EL SOPORTE EN REDES Y COMPUTACIÓN.
- A LA UNIDAD DE MICROSCOPIA. EN ESPECIAL A RODOLFO PAREDEZ-DÍAZ Y A LA DRA. ARACELI PATRÓN-SOBERANO.
- A BLANCA GUTIÉRREZ-CORTÉS, CARLOS GONZÁLEZ-GARCÍA, PAULINA BLANCAS, ALEJANDRA HERNÁNDEZ, JUAN MANUEL LIMA, RUBÉN GARCÍA, ALBERTO DE LA HERRAN Y BEATRIZ DE LA HERRAN. POR EL ENORME ENTUSIASMO Y APOYO EN LOS EXPERIMENTOS.
- AL SR. LINO AGUILAR POR HACER MAS FÁCIL MI TRABAJO EN EL LABORATORIO.
- A SARA, LORENA, ANGÉLICA Y ZENAIDA POR TODO EL APOYO DURANTE MIS ESTUDIOS.

AGRADEZCO AL JURADO PARA EXAMEN DE DOCTORADO
POR EL TIEMPO DEDICADO A LA REVISIÓN DE ESTA TESIS

DRA. HERMINIA PASANTES- MORALES

DR. RENÉ DRUCKER-COLÍN

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS-ROBLES

DR. STEFAN MIHAILESCU

DR. ROLANDO HERNÁNDEZ-MUÑOZ

DR. ALFREDO FERIA-VELASCO

DR. JOSE BARGAS-DÍAZ

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO	12
CÉLULAS TRONCALES/PROGENITORAS DE LA ZSV	18
VÍA ROSTRAL MIGRATORIA (VRM)	24
CÉLULAS TRONCALES EN EL HIPOCAMPO	27
FACTORES QUE REGULAN LA NEUROGÉNESIS	30
FACTORES INTERNOS	
GENÉTICOS Y MOLECULARES	31
FACTORES DE CRECIMIENTO	31
NEUROTRANSMISORES	32
HORMONAS	35
EDAD	35
FACTORES EXTERNOS	
MEDIOAMBIENTALES	37
NEUROGÉNESIS EN PROCESOS PATOLÓGICOS	38
PROCESOS INFLAMATORIOS	38
EPILÉPSIA	39
ISQUEMIA CEREBRAL	40
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	
ENFERMEDAD DE PARKINSON	41
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	42
ENFERMEDAD DE HUNTIGTON	43
ENFERMEDAD DE PARKINSON	44
TRATAMIENTO	46
MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	48
MODELO DE LA 6-HIDROXIDOPAMINA	48
MODELO DEL 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6- TETRAHIDROPIRIDINA	49

ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL	50
ANTECEDENTES HISTORICOS	50
PRINCIPIOS FÍSICOS Y MECANISMO DE ACCIÓN	52
MECANISMO DE ESTIMULACIÓN	56
SEGURIDAD E INOCUIDAD DE LA EMT	58
APLICACIONES CLÍNICAS	60
TERAPIA CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	64
TRASPLANTE CELULAR EN EL MODELO ANIMAL DE LA 6-OHDA	67
TRASPLANTE EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON	69
TRASPLANTE DE MÉDULA SUPRARRENAL	70
TRASPLANTE DE TEJIDO FETAL	72
CÉLULAS CROMAFINES (CCs) COMO MATERIAL DE TRASPLANTE	73
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	76
HIPÓTESIS	77
OBJETIVOS	77
MATERIAL Y METODOS	78
LESIÓN DE LA SUSTANCIA NIGRA	78
PRUEBAS CONDUCTUALES	79
OBTENCIÓN Y TRASPLANTE INTRACEREBRAL DE CCs	79
ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL	81
INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA A TH	82
MARCAJE DE CÉLULAS CROMAFINES CON FLUORO-GOLD	83
TRANSFECCIÓN DE CCs UTILIZANDO UN VECTOR ADENOVIRAL	84
ADMINISTRACIÓN IN VIVO DE 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA	85
INMUNOFLUORESCENCIA PARA BrdU, TH, NeuN y GFAP	86
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	87
MICROSCOPIA CONFOCAL	88
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	89
LIBERACIÓN DE DOPAMINA	89
ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO	91
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94

RESULTADOS

Lesión selectiva de las neuronas DA de la SNc por la inyección de 6-OHDA.	95
Recuperación funcional de la asimetría motora en ratas con lesión de la SNc.	96
Análisis de los cerebros por inmunofluorescencia a tirosina hidroxilasa.	98
Trasplante de células cromafines marcadas con Fluoro-Gold y GFP.	103
Caracterización de las células TH+ en la ZSV.	105
Immunoreactividad a BrdU y TH.	105
Immunoreactividad a TH y NeuN.	108
Immunoreactividad a TH y GFAP.	109
Caracterización funcional de las células TH+ de la ZSV.	110
Propiedades bioquímicas.	110
Propiedades electrofisiológicas.	114
-Algunas células TH+ presentan potenciales de acción.	116
-Corrientes sinápticas espontáneas registradas en las células TH+ de la ZSV.	124

DISCUSIÓN

Resultados de las pruebas conductuales.	126
Neurogénesis en la ZSV de ratas con lesión de la SNc, trasplante de CCs y EMT.	
Diferenciación in situ de CPN de la ZSV.	
Nuevas neuronas dopaminérgicas en la ZSV.	

CONCLUSIONES	133
---------------------	-----

REFERENCIAS	134
--------------------	-----

RESUMEN

La neurogénesis es un proceso que continúa en la zona subventricular (ZSV) del cerebro adulto de mamíferos. Los precursores neuronales generados en la ZSV migran a través de la vía rostral migratoria para reemplazar a las interneuronas del bulbo olfatorio. Sin embargo, en respuesta a la lesión de la sustancia *nigra* (SNc) algunos precursores que proliferan en la ZSV (identificados con BrdU) se diferencian *in situ* en células tirosina hidroxilasa (TH+). Este proceso se incrementa por efecto del trasplante de células cromafines (CCs) en el estriado denervado y/o la estimulación magnética transcraneal. Ninguna célula TH+ fue inmunoreactiva a GFAP, un 60% de las células TH+ expresaron NeuN (marcador de neuronas) y un 45% de las células TH+ colocalizaron con el transportador de dopamina (DAT). Además, en este estudio se examinaron las propiedades funcionales de las células TH+ generadas en la ZSV. Utilizando la técnica de célula completa, se registraron las células TH+ en la ZSV de animales con lesión de la SNc y trasplante de CCs. La mayoría de las células (TH+ o TH-) fueron no excitables. No obstante, un 11% de las células TH+ registradas en la ZSV presentaron características electrofisiológicas de neuronas dopaminérgicas de la SNc y además mostraron potenciales postsinápticos espontáneos. Además, se determinó la liberación de (DA) en la ZSV y en un fragmento proporcional del estriado. Doce semanas después de la lesión de la SNc, la liberación de DA disminuyó en un 70%. No obstante, 8 semanas después del trasplante de CCs en ratas con lesión de la SNc, la liberación de dopamina se recuperó en la ZSV e incluso superó la liberación obtenida en la ZSV de ratas control. Lo cual sugiere, que las células TH+ recientemente formadas en la ZSV liberan DA. Nuestros resultados, muestran por primera vez que la lesión de la SNc induce la diferenciación *in situ* de células precursoras que proliferan en la ZSV, las cuales expresan TH y adquieren propiedades de neuronas dopaminérgicas excitables. Adicionalmente, la liberación DA es Ca⁺⁺ dependiente. La integración a la red neuronal representa un hallazgo cuya importancia funcional se discute.

Palabras Clave: neurogénesis; zona subventricular; células troncales/progenitoras neuronales; lesión de la sustancia nigra; neuronas dopaminérgicas; enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

Neurogenesis in the adult mammalian brain continues in the subventricular zone (SVZ). Neuronal precursors from the SVZ migrate along the rostral migratory stream to replace olfactory bulb interneurons. However, after the substantia nigra (SN) lesion, several neural precursors from the SVZ (BrdU) differentiate into TH⁺ cells. Grafting of chromaffin cells (CCs) into the denervated striatum and/or transcranial magnetic stimulation increases the number of TH⁺ cells (SVZ TH⁺ cells). Any TH⁺ cell that is not co-labelled with GFAP, 60% of this TH⁺ cells co-labeled with NeuN (neuronal markers) and 45% of TH⁺ cells expressed dopamine transporter (DAT). Also, in this study examines the functional properties of these newly differentiating TH⁺ cells. Under whole-cell patchclamp, most SVZ cells recorded from lesioned and grafted animals (either TH⁺ or TH⁻) were non-excitabile. Nevertheless, a small percentage of SVZ TH⁺ cells had the electrophysiologic phenotype of mature dopaminergic neurons and showed spontaneous postsynaptic potentials. Dopamine (DA) release was measured in SVZ and striatum from both control and SN-lesioned rats. As expected, 12 weeks after SN lesion, DA release decreased drastically. Nevertheless, 8 weeks after CCs graft, release from the SVZ of SN-lesioned rats recovered, and even surpassed that from control SVZ, suggesting that newly formed SVZ TH⁺ cells release DA. This study shows for the first time that in response to SN-lesions, neural precursors within the SVZ change their developmental program and differentiate into TH⁺ cells, but more importantly by acquiring excitable properties of mature dopaminergic neurons. Additionally, the release of DA in a Ca⁺⁺ dependent manner and the attraction of synaptic afferents from neighboring neuronal networks gives further significance to the overall findings, whose potential importance is discussed.

Key Works: neurogenesis; subventricular zone; neural stem/progenitors cells; substantia nigra lesion; dopaminergic neurons; Parkinson's disease.

INTRODUCCIÓN

Uno de los dogmas fundamentales en las neurociencias mantenido hasta finales del 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 60's, utilizando la técnica de autoradiografía con timidina-³H para marcar células en división, permitieron demostrar la existencia de neurogénesis en algunas áreas del cerebro postnatal y adulto de la rata. Específicamente, se encontraron nuevas neuronas en el bulbo olfatorio [BO] y el giro dentado [GD] del hipocampo en el cerebro adulto (Altman y Das, 1965). Estas observaciones recibieron muy poca atención durante los años siguientes, hasta que en la década de los 90's diversos grupos reforzaron las investigaciones con las que se demostró que la neurogénesis persiste incluso en mamíferos como primates y humanos (Ericsson y col., 1998; Gould y col., 1999).

NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

En varias especies, durante la etapa postnatal y a lo largo de toda la vida, se ha demostrado que nuevas neuronas continúan generándose en el BO y GD. Además, se ha reportado neurogenesis en algunas áreas corticales (Gould y col., 1999) y en la sustancia *nigra* (Zhao y col., 2003). Cabe mencionar que estos últimos datos se han cuestionado en otros trabajos (Magavi y col., 2000; Frielingsdorf y col., 2004). Hoy en día, es posible especificar que las áreas en las cuales se ha demostrado actividad neurogénica en el cerebro adulto son: la zona subventricular [ZSV], la cual provee de nuevas neuronas al BO y la zona subgranular [ZSG] del GD en el hipocampo.

En estas dos zonas del cerebro adulto de mamíferos existen células con actividad mitótica, las cuales pueden ser clasificadas en 2 grupos: células troncales neurales [CTN, con un ciclo celular superior a 28 días], y células progenitoras neurales [CPN, con un ciclo celular de 12 horas] (Morshead y van der Kooy, 1992; Morshead y col., 1994). Las CTN tienen la capacidad de generar continuamente dos tipos de células: 1) nuevas CTN [capacidad de autorenovación] y 2) CPN. Las CPN al perder su capacidad mitogénica en etapas tempranas del desarrollo dan origen a neuronas, mientras que en etapas tardías del desarrollo originan astrocitos y oligodendrocitos (Reynolds y Weiss, 1992; Lois y Alvarez-Buylla, 1993).

Las células troncales embrionarias son pluripotentes; es decir, tienen la capacidad de originar todos los tipos celulares del organismo en desarrollo, mientras que las CTN del cerebro adulto pierden parte de esta capacidad, volviéndose multipotentes, lo que implica que solo pueden dar origen a tipos celulares específicos [FIGURA 1] (Gage, 2000; Price y Williams, 2001; Tsai y col., 2002; Vescovi y col., 2002; Wulf y col., 2001). Es importante señalar que se ha logrado aislar y cultivar CTN a partir de tejido cerebral *postmortem* de humanos adultos (Laywell y col., 1999; Roisen y col., 2001; Palmer y col., 2001).

A la fecha, la mayor controversia ha sido determinar la naturaleza de las células precursoras en las zonas neurogénicas del cerebro adulto. Hay dos teorías yuxtapuestas sobre el origen celular de las células troncales en la ZSV: 1) las células troncales de la ZSV provienen de células epéndimales que expresan nestina (Johansson y col., 1999; Chiasson y col., 1999); y 2) provienen de células del tipo astrocítico [GFAP⁺ y nestina⁺] (Doetsch y

col., 1999; Laywell y col., 2000). Cabe señalar, que las células precursoras del SNC y las células neuroepiteliales presentan inmunoreactividad a nestina [una proteína tipo VI de los filamentos intermedios], expresada en células troncales/progenitoras del neuroepitelio en desarrollo, tanto *in vivo* como *in vitro* (Frederiksen y McKay, 1988).

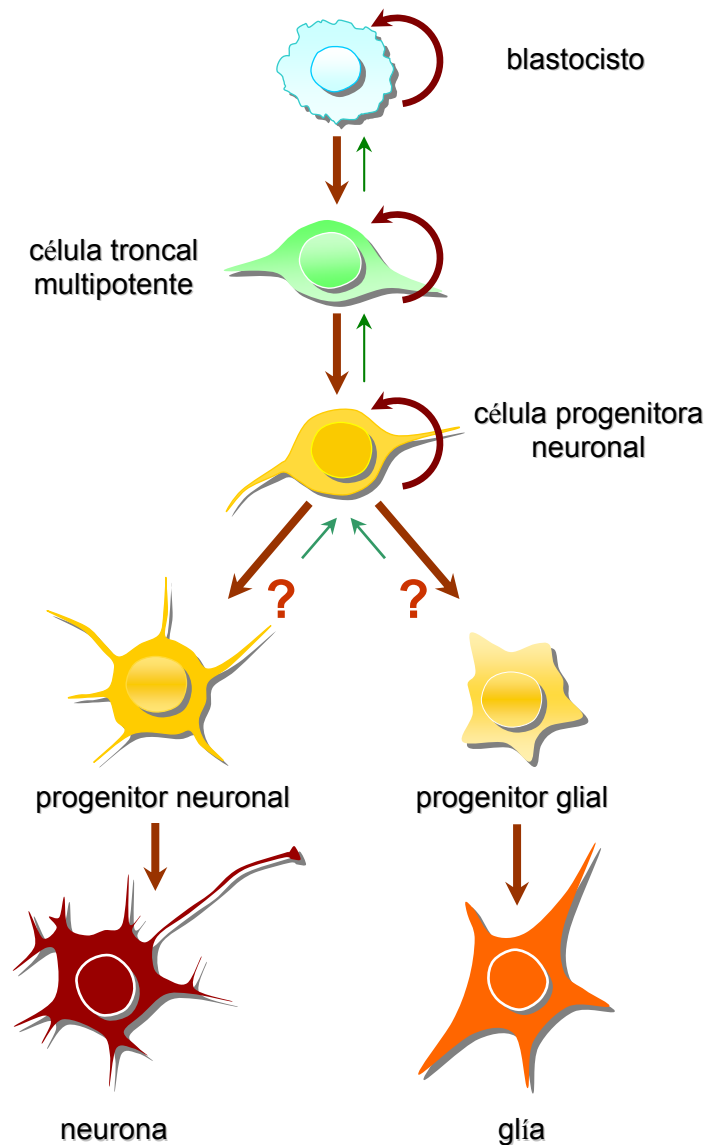


FIGURA 1 | Células troncales con potencial capacidad neurogénica. La figura muestra en orden jerárquico las células que en los mamíferos pueden dar origen a neuronas (modificado de Gage, 2000).

La mayoría de los estudios refuerza la última teoría, tanto en la ZSV como en la zona subgranular del GD en el hipocampo. Se ha demostrado que una población específica de la glía radial puede originar precursores neurales, los cuáles a su vez dan origen tanto a neuronas como a células de la glía (Alvarez-Buylla y col., 2001; Spassky y col., 2005). Durante el desarrollo embrionario tardío y postnatal, las células de la glía radial generan astrocitos (Cameron y Rakic, 1991; Misson y col., 1991) y en algunas especies, la glía radial mantiene sus propiedades precursoras aún en el animal adulto (Alvarez-Buylla y col., 1990). En este contexto, Merkle y colaboradores demostraron que en el adulto las células de la glía radial provienen de las células progenitoras de la ZSV (Merkle y col., 2004).

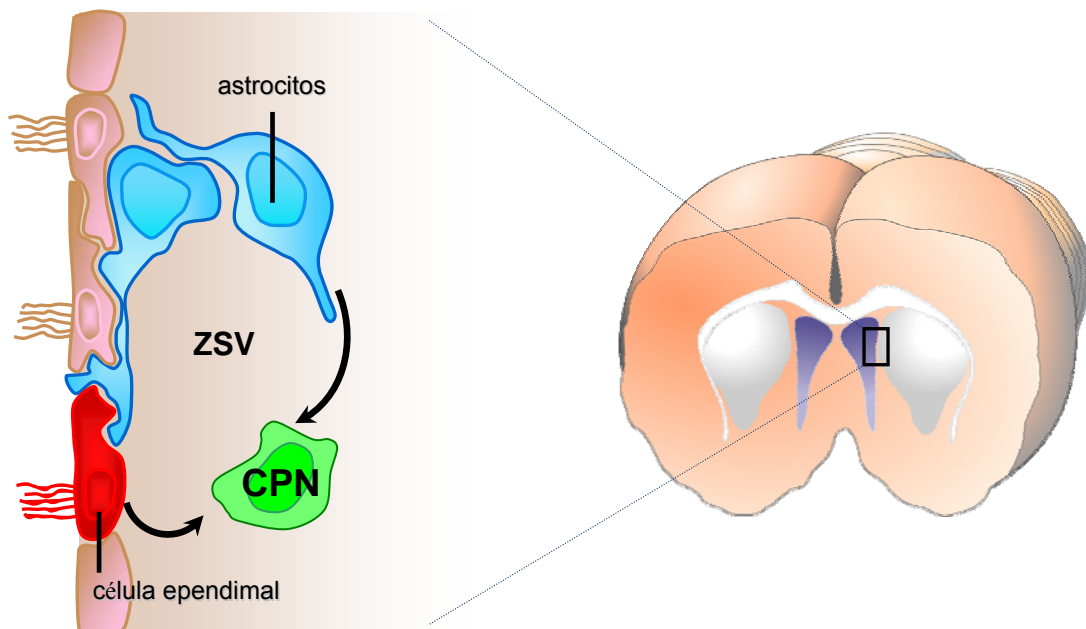


FIGURA 2 | Teorías sobre el origen de las células progenitoras neuronales en la ZSV. Existen dos teorías, en una se cree que las células progenitoras neuronales [CPN] se originan a partir de las células endodimensionales, mientras que en la otra se piensa que dichas células se generan de astrocitos. Los últimos trabajos muestran a las células astrocíticas como las protagonistas de la neurogénesis en la ZSV.

Por otro lado, estudios realizados sobre el origen de las neuronas corticales apuntan hacia dos direcciones. La primera sugiere que son las células de la ZSV las que las originan como sucede con las nuevas neuronas granulares y periglomerulares del BO (Bernier y Parent, 1998; Kornack y Rakic, 2001). La segunda teoría se basa en el comportamiento de células troncales que presentan las células de la glía radial, las cuales generan neuronas y células gliales (Hartfuss y col., 2001; Miyata y col., 2001; Malatesta y col., 2000; Noctor y col., 2001). En conjunto, estos datos soportan la idea de que las células troncales se desarrollan de un linaje neuroepitelial-glía radial-astrocítico [FIGURA 3] (Tramontin y col., 2003; Álvarez-Buylla y col., 2001).

Otro punto de controversia ha sido determinar si las nuevas neuronas originadas en el adulto provienen del mismo tipo de células neuroepiteliales que producen neuronas durante el desarrollo embrionario. Los tipos celulares retenidos dentro del neuroepitelio del sistema nervioso adulto, tales como las células endimales o las llamadas células de la glía radial, son probablemente los precursores neurales equiparables a las células neuroepiteliales embrionarias, de las cuáles son derivadas y las que conservan propiedades que les permiten responder a los patrones de señales que inducen neurogénesis en el embrión (Alvarez-Buylla y col., 2001; Tamamaki y col., 2001; Kintner, 2002]. Por lo tanto, las neuronas generadas en el adulto pueden tener distintos precursores, siendo algunos de ellos cercanos pero no directamente equivalentes a los del neuroepitelio embrionario. Por lo anterior, se cree que las células troncales en el adulto pueden ser más especializadas y solamente generar un rango limitado de subtipos neuronales. Además, estas células son incapaces de activar las cascadas de señalización que utilizan las células troncales embrionarias y que involucran a las proteínas proneurales bHLH (Kintner, 2002).

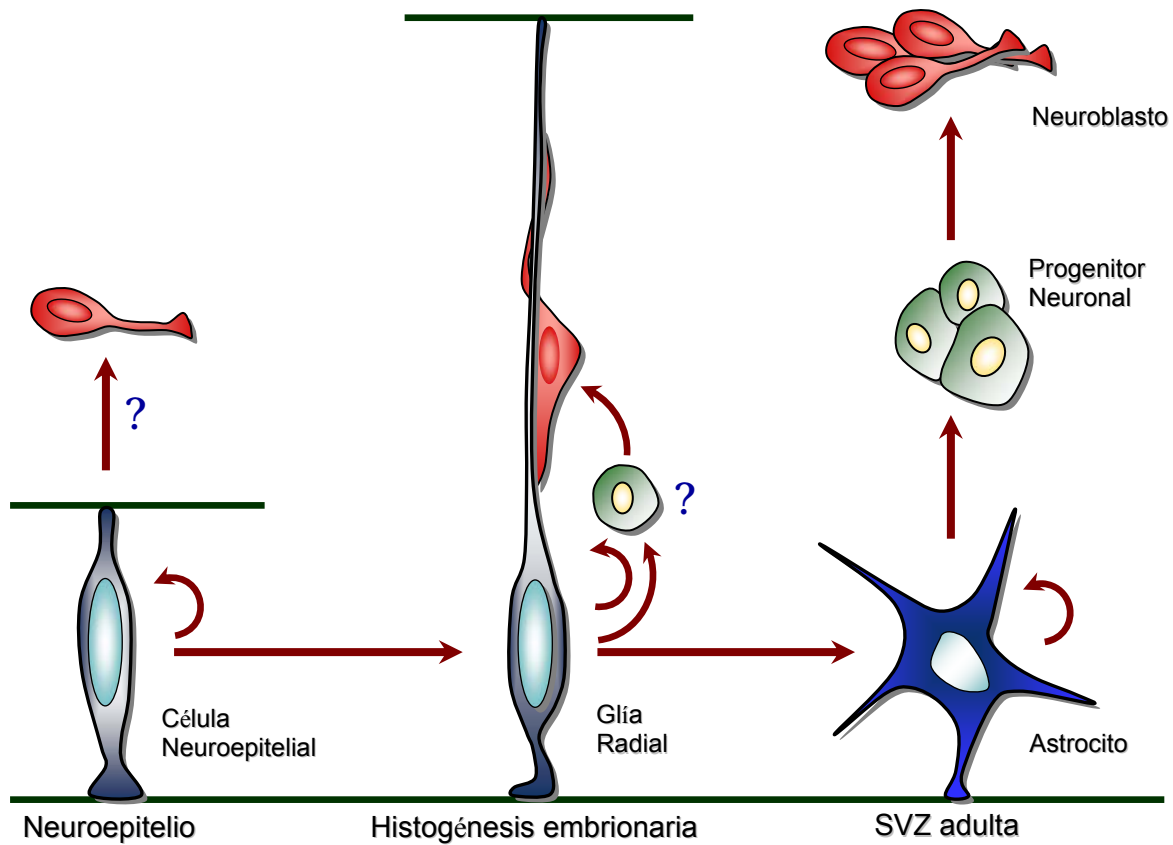


FIGURA 3 | **Hipótesis unificada para el desarrollo de células troncales neuronales.** Se cree que en el cerebro adulto, las células troncales/progenitoras neuronales se desarrollan de un linaje neuroepitelial-glia radial-astrocítico (Modificado de Álvarez-Buylla y col., 2001).

CÉLULAS TRONCALES/PROGENITORAS DE LA ZSV

Durante el desarrollo del cerebro de los mamíferos, se forma a lo largo de los ventrículos laterales una capa germinativa (la zona ventricular) rica en CPN que dan origen a las neuronas que migran hacia todas las estructuras del cerebro. A finales del desarrollo embrionario se origina otra capa de células germinativas adyacente a la zona ventricular (denominada ZSV), la cual también está implicada en generar nuevas neuronas. En el desarrollo postnatal disminuye progresivamente la generación de neuronas y finalmente, en el cerebro adulto, desaparece la zona ventricular manteniéndose únicamente nichos de proliferación en la ZSV. Las nuevas neuronas generadas en la ZSV migran a través de la vía rostral migratoria [VRM] hacia el BO [FIGURA 4-A], donde se diferencian en dos tipos de interneuronas: las células granulares y las células periglomerulares (Altman, 1969; Corotto y col., 1993; Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994).

Diversas investigaciones, han permitido determinar la presencia y características de las CTN en la ZSV del cerebro adulto de roedores (Reynolds y Weiss, 1992; Doetsch y col., 1997; Doetsch y col., 1999; Seaberg y Van der Kooy, 2002; Song y col., 2002). Estudios cuantitativos indican que la tasa de neurogénesis en la ZSV del cerebro adulto de rata es de aproximadamente 80,000 nuevas neuronas granulares por BO, esto representa el 1% de la población de células granulares olfatorias por día (Kaplan y col., 1985).

A partir de los estudios realizados, se ha determinado que en la ZSV existen al menos cuatro tipos diferentes de células de acuerdo con su morfología, ultraestructura, propiedades electrofisiológicas y marcadores específicos que permiten su identificación [FIGURA 4-B, 8]. Estos tipos celulares son: 1) células endociliares o células tipo E, ubicadas hacia el lumen del ventrículo, las cuales participan en la circulación del líquido cefalorraquídeo [LCE]; 2) neuroblastos proliferativos o células tipo A, las cuales presentan migración en cadena hacia el BO; 3) células astrocíticas de proliferación lenta o células tipo B; y 4) células transitorias amplificadoras o células tipo C, de proliferación activa y que forman cúmulos espaciados entre las cadenas formadas por las células tipo A en toda la ZSV (Alvarez-Buylla, A. y García-Verdugo, J.M., 2002). La división de las células tipo B [astrocitos monociliados de la SVZ] y C [células transitorias amplificadoras] sugiere que uno o ambos tipos celulares están implicados en la generación de nuevas neuronas [células tipo A o neuroblastos]. Sin embargo, las células tipo A son incapaces de autorenovarse *in vitro* (Lim y Álvarez-Buylla, 1999). A pesar de que se propuso que la CTN de la ZSV podría ser la célula tipo E, los trabajos de Doetsch y col., (1999), y más recientemente Spassky y col., (2005), contradicen esta hipótesis y muestran a las células astrocíticas como las protagonistas de la neurogénesis en la ZSV. En los experimentos de Doetsch se observó que la administración del antimetabólico citosina- β -D-arabinofuranósido [AraC] elimina a las células tipo A y C pero no a las células tipo B. Una vez que cesa el tratamiento con AraC, la población de células tipo C se regenera y posteriormente se observan los neuroblastos.

Así, las células tipo B son las células precursoras de las nuevas neuronas y son capaces de generar neuroesferas [agregados de CTN y CPN] *in vitro*, en respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos [FGF] y al factor de crecimiento epidermal [EGF] (Doetsch

y col., 1999; Laywell y col., 2000). La capacidad de generar neuroesferas *in vitro* también ha sido observada en los astrocitos extraídos de cualquier área cerebral de animales jóvenes (menos de 10 días), capacidad que se pierde con el desarrollo postnatal y con la maduración cerebral (Laywell y col., 2000). Estos resultados demuestran el potencial neurogénico de las células tipo B presentes en la ZSV del cerebro adulto y unifica el linaje del cual provienen las neuronas y la neuroglía. Con base en estos resultados, se ha propuesto un modelo neurogénico en la ZSV, en el cual las células tipo B dan origen a las células tipo C y éstas a su vez a las células tipo A [FIGURA 4-B].

Con los trabajos de Merkle y col., (2004) se ha descubierto que los astrocitos neurogénicos de las etapas adultas derivan de glía radial que persiste en la pared de los ventrículos laterales de ratas recién nacidas. Al utilizar marcadores moleculares en las células de la glía radial en desarrollo, se observó que las células de la glía radial del neonato dan origen a neuronas, astrocitos, células endimales y oligodendrocitos, y posteriormente desaparecen a pocos días del nacimiento. En la VRM se observó la presencia de neuroblastos marcados en todas las etapas de la edad adulta e incluso se encontró que nuevas neuronas continúan generándose a partir de los precursores derivados de la glía radial. Con este trabajo se concluyó que la glía radial es la célula precursora de neuronas y células gliales en la etapa neonatal, además de que genera a las células tipo B de la ZSV, las cuales continúan generando nuevas neuronas a lo largo de la vida adulta.

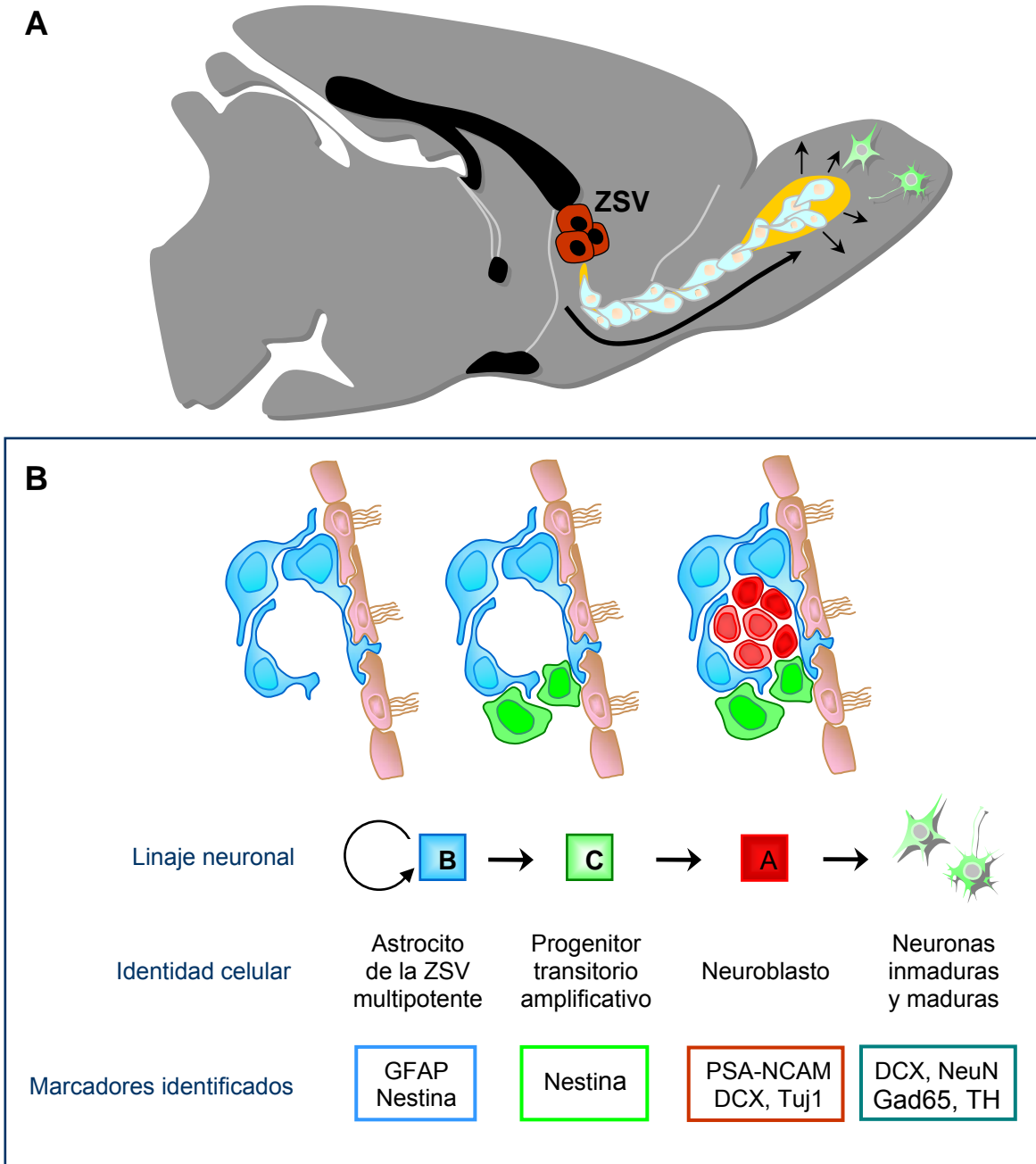


FIGURA 4 | **Neurogénesis en el sistema ZSV-BO.** A) La figura ilustra una vista sagital del cerebro de una rata adulta mostrando las CPN en la ZSV y su migración hacia el BO. B) Secuencia de los tipos celulares involucrados en el linaje neuronal y sus marcadores específicos (Modificado de Doetsch y col., 1999; Abrous y col., 2005).

Las células tipo A, formadas a partir de los astrocitos subventriculares [células tipo B] migran posteriormente una distancia considerable, alrededor de 5 mm en roedores y hasta 20 mm en primates, durante un periodo de 6 a 15 días para alcanzar el BO [FIGURAS 5 Y 6]. A pesar de que se ha sugerido que el BO puede tener un carácter quimioatractor, su participación en la proliferación, migración y diferenciación de las células recientemente formadas permanece incierta. Al alcanzar la parte media del BO, las nuevas neuronas se separan de las cadenas formadas por las células tipo A y migran radialmente para dirigirse a la capa granular y periglomerular [FIGURA 5]. Ahí llegan como neuronas inmaduras, las cuales extienden ramificaciones dendríticas y más adelante se diferencian en interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas [FIGURA 6] (Carleton y col., 2003).

Con base en estas investigaciones, podemos definir a la neurogénesis en la ZSV del cerebro adulto como el proceso mediante el cual las células troncales/progenitoras neuronales proliferan en la ZSV, originan neuroblastos que migran en cadena al BO donde se diferencian en interneuronas que se integran a la red neuronal y sobreviven, manteniendo así la homeostasis del BO [FIGURA 5] (Arias-Carrión y Col., 2006).

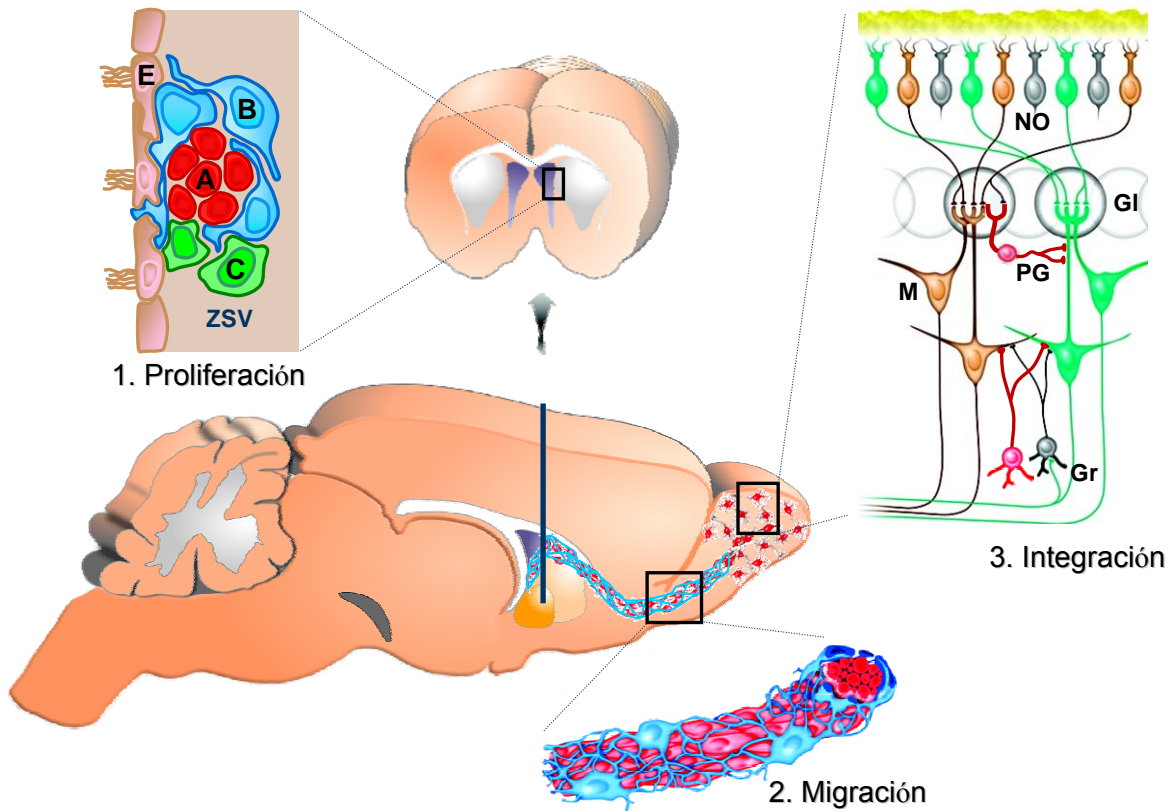


FIGURA 5 | Esquema sagital del cerebro de una rata adulta que muestra la migración tangencial y radial de las nuevas neuronas desde la ZSV hasta el BO siguiendo la VRM. La migración tangencial de las nuevas neuronas en la VRM se divide en tres fases simultáneas: 1) Las células ya están migrando pero aún son capaces de dividirse. Las células migratorias con actividad mitótica se observan en las regiones más cercanas a la ZSV adyacente a los ventrículos laterales. 2) En un momento determinado dentro de la VRM, las células salen del ciclo celular y continúan su proceso de migración hacia el BO. 3) Una vez dentro del BO, las células cambian su migración tangencial por radial e invaden el parénquima de esta estructura, diferenciándose en células granulares y periglomerulares. *Abreviaturas:* NO, nervio olfatorio; GI, células glomerulares; PG, células periglomerulares; M, células mitrales; Gr, células granulares.

VÍA ROSTRAL MIGRATORIA (VRM)

La VRM es la única estructura del cerebro que posee una ruta larga de migración. Se inicia en la ZSV con la partida de las células tipo A y finaliza con el arribo de las nuevas interneuronas en el BO (Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Fukushima y col., 2002). Los neuroblastos presentes en la VRM presentan una morfología alargada y forman cadenas entre ellos, esto facilita su migración hacia el BO (Lois y col., 1996; Kishi, 1987; Lois y Álvarez-Buylla, 1994). Estas cadenas de neuroblastos se desplazan entre estructuras tubulares integradas por células gliales [astrocitos], las cuales secretan factores de crecimiento que favorecen el proceso de migración (Lois y col., 1996; Wichterle y col., 1997; Mason y col., 2001). Los tubos de células gliales [conocidos también como glía radial o glía de Bergmann] (Rakic, 1995; Rakic y Sidman, 1973) sirven de soporte direccional y contribuye en la supervivencia de los neuroblastos, evitando que estos salgan prematuramente de la ruta de migración (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Los neuroblastos en migración presentan conos de crecimiento muy desarrollados y en proceso activo de extensión y retracción, lo cual sugiere que estas células usan los mismos mecanismos de locomoción usados por los axones en crecimiento (Wichterle y col., 1997).

Distintos estudios demuestran la importancia de las moléculas de adhesión [como las integrinas] y de la matrix extracelular [como tenascina y el sulfato de condroitina] en la migración de los neuroblastos a lo largo de la VRM (Jacques y col., 1998; Thomas y col., 1996; Bonfanti y Theodosios, 1994; Rousselot y col., 1995). Concretamente, la PSA-NCAM parece estar implicada en el establecimiento de contactos entre los neuroblastos de las

cadena migratorias y las células gliales que forman los tubos de migración (Cremer y col., 1994). Además, la presencia de factores quimiorrepulsivos en el área septal, tales como los inhibidores migratorios Slits, parece jugar un papel importante en prevenir la migración de los neuroblastos hacia ciertas zonas cerebrales (Mason y col., 2001). Cabe mencionar que las nuevas interneuronas generadas a partir de CPN de la ZSV del cerebro adulto que migran hacia el BO por la VRM, presentan potenciales de acción de forma espontánea y reciben contactos sinápticos hasta que se integran a la red neuronal del BO [FIGURA 6].

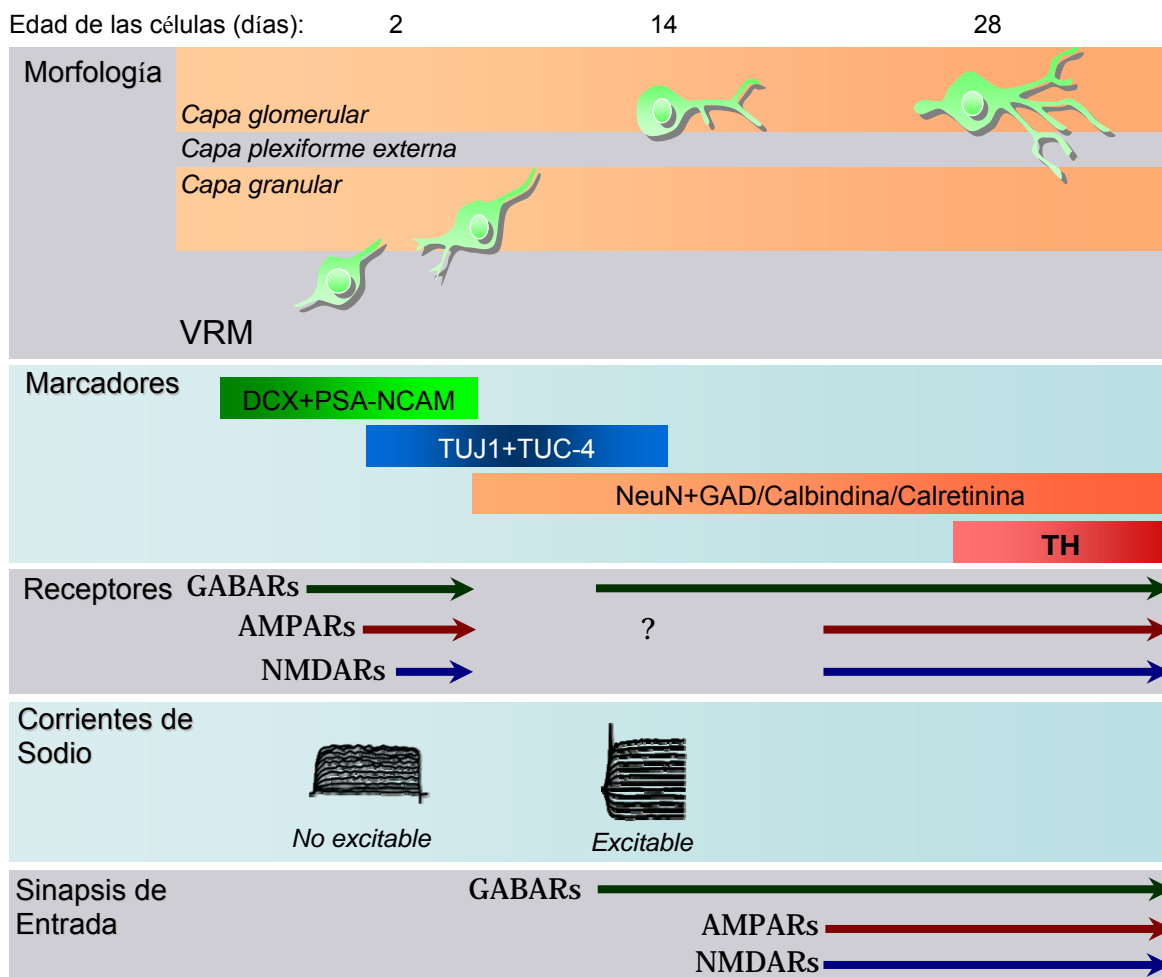


FIGURA 6 | **Maduración postmitótica de las nuevas neuronas en el cerebro adulto.** La figura muestra los cambios morfológicos y funcionales que presentan las nuevas neuronas antes de integrarse a los circuitos neuronales del cerebro adulto.

Las nuevas interneuronas que se integran a la capa periglomerular expresan marcadores neuronales y reciben contactos sinápticos una vez que se integran a la circuiteria neuronal [FIGURA 6] (Carleton y col., 2003). El recambio continuo de las interneuronas del BO se modifica por cambios en el microambiente o modificaciones relevantes en los olores percibidos (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Animales knockout para la NCAM [la cual en condiciones normales esta altamente expresada en la VRM] presentan una disminución significativa en el número de interneuronas en el BO (Gheusi y col., 2000). Estos animales knockout no son capaces de discriminar los distintos olores, sin embargo, su capacidad para recordar olores, así como, su sensibilidad olfativa no están afectadas. Estos datos sugieren que las nuevas neuronas que migran hacia el BO participan en el reconocimiento olfatorio. Las nuevas interneuronas generadas en la ZSV también se incorporan al bulbo olfatorio accesorio (Bonfanti y col., 1997), el cual está implicado en el procesamiento de la información olfatoria asociada con el comportamiento sexual. Se sabe que la neurogénesis en la ZSV se incrementa durante la fase estrogénica (Smith y col., 2001) y como respuesta a la prolactina a finales del embarazo (Shingo y col., 2003). Finalmente, los reportes indican que en condiciones fisiológicas, el recambio de las nuevas neuronas en el BO esta regulado por factores hormonales asociados con el comportamientos sexual [en donde hay un incremento de feromonas] regulado por el sistema límbico [principalmente por el hipotálamo].

CÉLULAS TRONCALES EN EL HIPOCAMPO

Las CPN del hipocampo son generadas en la zona subgranular y dan origen a células gliales y neuronas en la capa granular del GD (Eckenhoff y Rakic, 1988; Stanfield y Trice, 1988). Estudios realizados con trazadores neuronales retrógrados han permitido mostrar que las nuevas neuronas granulares del GD envían sus axones a la región CA3 del hipocampo, dos semanas después de que ocurre la mitosis (Stanfield y Trice, 1988; Markakis y Gage, 1999; Hastings y Gould, 1999). Aproximadamente, unas 250,000 nuevas neuronas se incorporan al mes en el GD, es decir, un 6% de la población celular total del GD (Cameron y McKay, 2001).

Para diferenciar los diferentes tipos celulares presentes en la zona subgranular [ZSG] del GD en el hipocampo se han realizado diversos estudios. De ellos se sabe que las células que conforman la ZSG son: 1) Astrocitos radiales de la ZSG [células B, GFAP⁺] localizados en la parte más interna, de cara hacia el hilus; 2) Células precursoras (células D, PSA-NCAM⁺, GFAP⁻); y 3) las nuevas neuronas granulares (células G, PSA-NCAM⁺), las cuales presentan características electrofisiológicas de las neuronas diferenciadas (Seri y col., 2001 y 2004), [FIGURA 7].

Las células troncales de la ZSG son un tipo específico de astrocitos denominados astrocitos radiales [células B, nestina⁺, GFAP⁺, S-100β⁻] (Seri y col., 2001 y 2004). Estudios realizados en animales quiméricos [nestina/GFP], muestran a los astrocitos

radiales como las células troncales de la ZSG (Filippov y col., 2003). Los astrocitos radiales de la ZSG dan origen a los primeros precursores intermediarios [las células D, PSA-NCAM⁺], y estos a su vez originan las nuevas neuronas granulares [células G, PSA-NCAM⁺] (Seri y col., 2001 y 2004). Por otra parte, en la ZSG también se encuentra otro tipo de astrocitos, llamados astrocitos horizontales [células B, GFAP⁺, S-100β⁻] (Seri y col., 2004). Estos astrocitos no tienen características de células troncales, sin embargo, conservan la actividad mitótica de los precursores neurales y se distinguen de los astrocitos radiales por su morfología y determinados marcadores moleculares (Seri y col., 2004). Los resultados experimentales indican que son los astrocitos radiales los que dan origen a los astrocitos horizontales (Seri y col., 2004), los cuáles a su vez son los precursores de los oligodendrocitos (Romero-Aleman y col., 2003; Vives y col., 2003).

Las células troncales de la ZSG del GD adulto son capaces de generar neuronas, las cuáles desarrollan todas las características de las neuronas maduras del SNC: son no-mitóticas y polarizadas, poseen axones y dendritas, forman sinapsis eficientemente, son eléctricamente activas, presentan potenciales de acción en respuesta a estímulos sinápticos tanto inhibitorios como excitatorios y, son capaces de liberar los neurotransmisores clásicos en respuesta a potenciales de acción (Song y col., 2002). Sin embargo, la funcionalidad de estas neuronas no es tan efectiva como la que se observa en las neuronas que se generan a partir de células troncales en desarrollo (Song y col., 2002). Contrario a lo que sucede con las neuronas generadas en la ZSV, las nuevas neuronas de la ZSG se desplazan en distancias cortas dentro de la capa de células granulares.

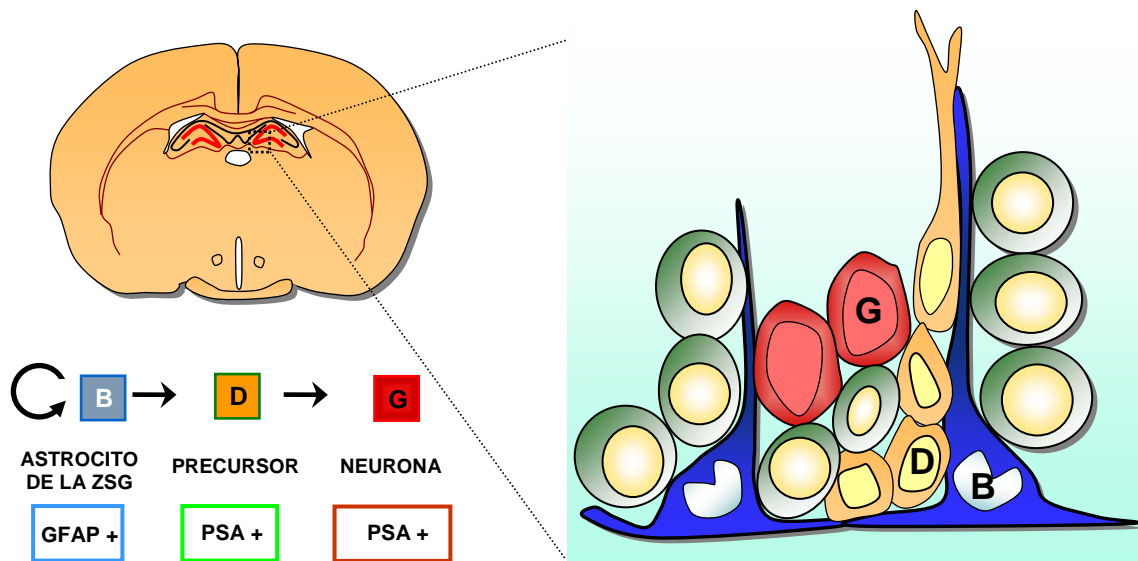


FIGURA 7 | **Organización y tipos celulares en la ZSG.** Esquema de una sección coronal del cerebro de ratón adulto mostrando el giro dentado (en rojo) y los tipos celulares en la SGZ: los astrocitos de la SGZ (B, en azul, GFAP+) son los precursores primarios *in vivo* y dan origen a los precursores intermedios (D, en amarillo, GFAP⁻, PSA-NCAM⁺), los cuáles generan las nuevas neuronas granulares (G, en rojo, GFAP⁻, PSA-NCAM⁺).

La función de las nuevas neuronas generadas en la ZSG se desconoce. De igual forma, la función específica del GD en el cerebro es desconocida, pero se cree que puede concurir en los procesos de aprendizaje y memoria del hipocampo (Barnea y Nottebohm, 1996; Gould y col., 1999; Feng y col., 2001; Shors y col., 2001). Se sabe que las neuronas del GD reciben información de otras áreas del cerebro [especialmente del sistema límbico], y que distintos neurotransmisores del SNC tienen terminales en la ZSG (Kempermann y col., 2004). Además, hay reportes que indican que las nuevas neuronas del GD se proyectan hacia la región CA3 del hipocampo (Treves y Rolls., 1994). Con los resultados anteriores, se puede concluir que el GD participa en la codificación de la información que será utilizada por la zona CA3 del hipocampo (Kempermann y col., 2004; Aimone y col., 2006).

FACTORES QUE REGULAN LA NEUROGÉNESIS

Diversas investigaciones indican que las nuevas neuronas que se generan en la ZSG del GD en el hipocampo participan en el procesamiento de la memoria (Gheusi y col., 2000; Shors y col., 2001), mientras que las nuevas interneuronas que se incorporan al BO participan en la integración de la información olfatoria (Carleton y col., 2003). Hasta ahora, se desconoce si los mecanismos que regulan la neurogénesis en las dos áreas germinativas del cerebro adulto son los mismos que durante el desarrollo. El control en el número de CTN y la diferenciación de las CPN son procesos regulados por factores específicos de la zona en la cuál residen (Álvarez-Buylla y Lim, 2004). Al parecer, el microambiente que regula la neurogénesis durante el desarrollo embrionario y postnatal se conserva en el cerebro adulto.

La neurogénesis en el cerebro adulto está regulada de manera positiva o negativa por diversos mecanismos. Además, existen factores internos y externos que participan en dicha regulación. Entre los factores internos se encuentra la expresión de genes, moléculas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores; la edad es otro factor interno involucrado en la neurogénesis. Entre los factores externos se pueden mencionar los estímulos medioambientales y farmacológicos (Duman y col., 2001).

A continuación se mencionan algunos de los factores internos y externos involucrados en la neurogénesis del cerebro adulto.

FACTORES INTERNOS

GENÉTICOS Y MOLECULARES

Entre las moléculas que inducen neurogénesis y morfogénesis en el cerebro en desarrollo se pueden mencionar *Notch*, *BMPs*, *Eph/ephrins*, *Noggin*, y *Shh*. Estas moléculas participan también regulando la proliferación y diferenciación celular en las zonas neurogénicas del cerebro adulto (Álvarez-Buylla y Lim, 2004). Por otro lado, durante el desarrollo un gran número de genes proneurales [de la familia bHLH] regulan la determinación y diferenciación celular de las células troncales (Kintner, 2002). Algunos de esos genes, se expresan en las zonas neurogénicas del cerebro adulto en respuesta a un estímulo o lesión (Hallbergson y col., 2003).

FACTORES DE CRECIMIENTO

La expresión de diversos factores de crecimiento [como BDNF, IGF-I, FGF-2, EGF, HB-EGF, VEGF], implicados en la regulación del destino celular, puede determinar el tamaño de la población neuronal o glial, tanto en cerebros en desarrollo como en el cerebro adulto (Kuhn y col., 1997; Pencea y col., 2001). Estos factores se sobreexpresan en distintos modelos neurodegenerativos en donde participan como factores protectores de daño neuronal o como factores inductores durante la generación y diferenciación de nuevas células que reemplacen a las células lesionadas (Kuhn y col., 2001; Pencea y col., 2001; Aberg y col., 2000; Kuhn y col., 1997).

Se ha demostrado que la administración intracerebroventricular [*icv*] del factor neurotrófico derivado del cerebro [BDNF] incrementa la neurogénesis en el BO (Zigova y col., 1998). Además, se sabe que el BDNF es necesario para mantener la tasa de neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos (Lee y col., 2002). Por otro lado, la infusión por vía periférica del factor de crecimiento tipo insulina [IGF-I] incrementa la neurogenesis en el hipocampo de ratas adultas (Aberg y col., 2000). También se ha demostrado que el factor de crecimiento de fibroblastos [FGF-2] y el factor de crecimiento epidérmico [EGF] tienen efectos específicos sobre las CPN *in vivo*. Así, la infusión *icv* de FGF-2 incrementa el número de nuevas neuronas en el BO, mientras que la infusión de EGF reduce el número de neuronas que llegan al BO, pero se incrementa el número de astrocitos en el BO (Kuhn y col., 1996). En contraste con estos resultados, Craig y col., (1996) encontraron que la infusión *icv* de EGF y FGF-2 incrementa la neurogénesis en la ZSV. Otras observaciones indican que hay un incremento en la neurogénesis de la ZSV y GD después de la administración *icv* del factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina [HB-EGF] (Jin y col., 2002a) y del factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF] (Jin y col., 2002b).

NEUROTRANSMISORES

Actualmente, se conoce que diversos neurotransmisores participan como factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto. Entre los más estudiados se encuentran, el glutamato y monoaminas como la serotonina (5-HT), noradrenalina, GABA y dopamina.

El glutamato es considerado el neurotransmisor más importante para la función del encéfalo. Se sabe que regula la neurogénesis en el hipocampo de animales adultos. La mayoría de los estudios se han enfocado en el receptor NMDA. Los reportes indican que la administración de NMDA disminuye la neurogénesis en el hipocampo. Sin embargo, cuando se administra el antagonista del receptor NMDA se incrementa la neurogénesis [MK-801, CGP 43487] (Cameron y col., 1995; Cameron y col., 1998; Nacher y col., 2001). Además, se ha demostrado que como respuesta a la lesión de la corteza entorrinal (la cual es la mayor entrada glutamatérgica del hipocampo) se incrementa la proliferación celular en el giro dentado (Cameron y col., 1995). Además, algunos reportes indican que otros receptores glutamatérgicos, como el receptor AMPA (Bai y col., 2003) o los receptores metabotrópicos (Yoshimizu y Chaki., 2004) pueden estar involucrados en la regulación de la proliferación celular en el hipocampo.

La participación de la 5-HT en la neurogénesis se demostró en varias investigaciones [FIGURA 10] (Gould, 1999). La lesión de las neuronas serotoninérgicas o la inhibición de la síntesis de 5-HT, ha permitido ver una disminución en la tasa de proliferación tanto en el hipocampo como en la ZSV (Brezun y Daszua., 1999; 2000). La administración de D-fenfluramina [un agente que induce la liberación de 5-HT], incrementa el número de células marcadas con BrdU en el hipocampo, este efecto se bloquea administración previamente WAY 100635 [antagonista de la 5-HT_{1A}] (Jacobs y col., 1998). Por el contrario, la administración del agonista 5-HT_{1A}, el 8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina, incrementa el número de células marcadas con BrdU (Jacobs y col., 1998). Se sabe que el receptor de la 5-HT_{1A} participa en la regulación de la neurogénesis en

el cerebro adulto. Sin embargo, la 5-HT también podría regular la neurogénesis a través de otros subtipos de receptores, como 5-HT_{2A} o 5-HT₇ (Duman y col., 1997).

El sistema noradrenérgico también está implicado en la regulación de la neurogénesis del cerebro adulto. Se ha demostrado que al inhibir la liberación de noradrenalina disminuye la proliferación, pero no se afecta la diferenciación o supervivencia de las nuevas células en el hipocampo (Kulkarni y col., 2002). En contraste, al bloquear el receptor α_2 -adrenérgico en el BO de la rata, por la administración sistémica del antagonista Dexefaroxan, no se observan cambios en el número de células marcadas con BrdU en la SVZ [FIGURA 8], pero se incrementa la sobrevivencia de las nuevas interneuronas en el BO (Bauer y col., 2003).

La dopamina es otro neurotransmisor implicado en la regulación de la neurogénesis tanto en la ZSV como en el hipocampo del cerebro adulto [FIGURA 8]. Se ha demostrado experimentalmente, que la depleción de dopamina disminuye la generación de nuevas neuronas tanto en la ZSV como en el giro dentado en el hipocampo (Höglinger y col., 2004). Estudios recientes, indican que la dopamina activa al receptor D₃ localizado en las CPN de la ZSV y del hipocampo, regulando mediante este mecanismo la neurogénesis en el cerebro adulto (Van Kampen y col., 2004).

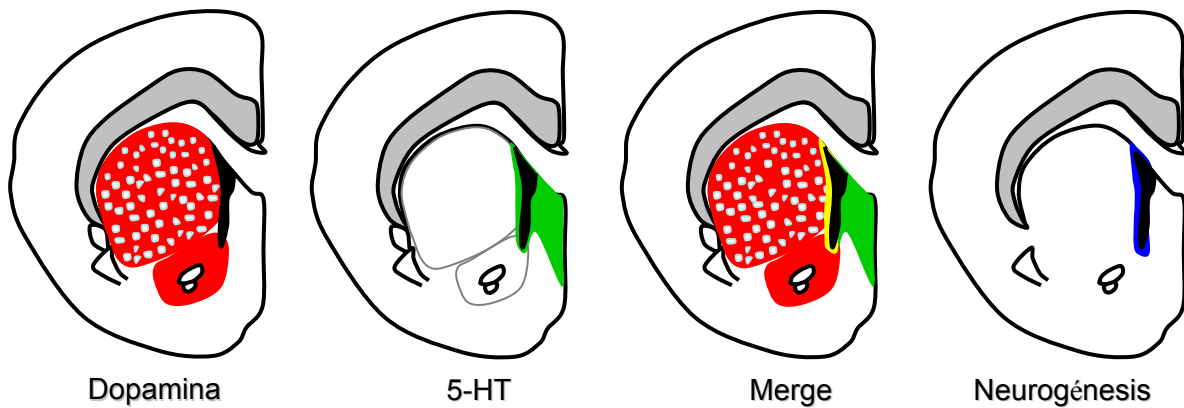


FIGURA 8 | Dopamina y serotonina en la ZSV. La figura muestra dos de los neurotransmisores más importantes del cerebro. Las proyecciones dopaminérgicas y serotoninérgicas se entrecruzan en la zona marcada en amarillo, la cual limita la ZSV (azul). Esto sugiere la cooperación de los dos neurotransmisores para generar el nicho neurogénico en la ZSV.

HORMONAS

Algunos reportes indican que los esteroides ováricos, así como los estrógenos endógenos, tienen un efecto estimulante en la proliferación de los precursores de la ZSG del GD (Tanapat y col., 1999; Ormerod y Galea, 2001; Banasr y col., 2001). Un estudio en ratas demuestra que la tasa de neurogénesis se incrementa un 65% durante el embarazo, alcanzando su pico máximo justo antes del parto, el cual coincide con los niveles de prolactina (Shingo y col., 2003).

EDAD

Se sabe que la edad es uno de los factores más importantes en la regulación de la neurogénesis en el cerebro adulto. El número de células marcadas con BrdU se reduce en

el giro dentado conforme las ratas y primates envejecen (Kuhn y col., 1996; Gould y col., 1999). Sin embargo, este decremento no se ha observado en la ZSV de ratas viejas (Kuhn y col., 1996), pero se ha reportado una disminución en el número de CPN en la ZSV de ratones viejos (Maslov y col., 2004). Al parecer, estos cambios observados en la proliferación celular de las CPN presentes en el hipocampo, se relacionan con los niveles elevados de glucocorticoides (Sapolsky, 2004). Los reporten indican que como consecuencia de la adrenalectomía, se reducen drásticamente los niveles de esteroides suprarrenales, lo que trae como resultado un incremento en la proliferación celular en el hipocampo en ratas jóvenes y viejas (Cameron y McKay., 1999). Estos trabajos sugieren que los esteroides suprarrenales inhiben la neurogénesis durante toda la vida adulta.

Podemos concluir, que la tasa de neurogénesis en el cerebro adulto disminuye conforme se incrementa la edad (Kuhn y col., 1996; Bizon y Gallagher, 2003; Bondolfi y col., 2004). Sin embargo, al inducirse neurogénesis en el giro dentado, se observa una mayor proliferación en los animales viejos que en los animales jóvenes (Kepermann y col., 2003), probablemente por una mayor plasticidad neuronal en las etapas tempranas del desarrollo.

FACTORES EXTERNOS

MEDIOAMBIENTALES

La neurogénesis no es un proceso biológico estático, ya que su tasa es variable y depende del microambiente (Peterson, 2002). Es conocido que la actividad física, los ambientes enriquecidos [cajas con objetos novedosos], la restricción energética, la modulación de la actividad neuronal, entre otros, actúan como reguladores positivos de la neurogénesis (Tanapat y col., 2005; Mirescu y col., 2004; Gould y col., 2000; Tanapat y col., 1999; Van Praag y col., 1999; Kempermann y col., 1997; Gould, 1994; Gould y col., 1994; Gould y col., 1992). En los animales que viven en un ambiente enriquecido presentan un incremento en la neurogénesis de la ZSG del GD (Mirescu y col., 2004; Nilsson y col., 1999; Kempermann y col., 1997; Barnea y Nottebohm, 1994). Sin embargo, en los animales que viven en condiciones de estrés, la neurogénesis en esta zona disminuye o es inhibida totalmente (Gould y col., 1997 y 1998; Tanapat y col., 2001). Además, las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal inducidas por estrés durante el desarrollo, disminuyen la generación de nuevas células en el GD (Lemaire y col., 2000; Lenington y col., 2003). Así, se sabe que la proliferación celular en el GD es disminuida por el efecto de los glucocorticoides, los cuáles son liberados en respuesta al estrés (Tanapat y col., 2001).

NEUROGÉNESIS EN PROCESOS PATOLÓGICOS

La investigación generada en los últimos años, ha permitido aceptar que nuevas neuronas continúan generándose en el cerebro adulto de mamíferos. La importancia funcional de las nuevas neuronas está aún bajo investigación. Sin embargo, existen resultados sorprendentes, los cuales indican que las nuevas neuronas se integran al cerebro adulto y participan en diferentes procesos cognoscitivos (Carleton y col., 2003; Kemperman y col., 2004; Macklis, 2001; Shors y col., 2001, Van Praag y col., 2002; Lledo y col., 2006). Por otro lado, diferentes reportes indican que una reducción significativa en la tasa de neurogénesis del cerebro adulto, posiblemente está implicada en la fisiopatología de diferentes enfermedades neurológicas como depresión, epilepsia o enfermedades neurodegenerativas (Abrous y col., 2005). Además, se ha despertado un gran interés en la neurogénesis del cerebro adulto por las potenciales aplicaciones terapéuticas (Martino y Pluchino, 2006).

PROCESOS INFLAMATORIOS

Se ha demostrado experimentalmente, que diversos procesos inflamatorios en el cerebro adulto reducen la tasa de proliferación celular en el hipocampo (Ekdahl y col., 2003; Monje y col., 2003). Los diferentes estudios indican que este efecto se debe al grado de activación de la microglía, el cual es mediado por citocinas, como interleucina-6 [IL-6] (Villiers y col., 2002). También se ha demostrado que al inhibir la activación de la microglía con minociclina (Ekdahl y col., 2001) o indometacina (Monje y col., 2003), se

restaura la neurogénesis en el hipocampo durante el proceso inflamatorio. La neuroinflamación y la activación de la microglía se han asociado con la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas, por lo cual, el tratamiento coadyuvante con anti-inflamatorios representan una nueva estrategia terapéutica.

EPILEPSIA

Las crisis epilépticas inducidas por diversas manipulaciones experimentales [Pilocarpina, Ácido Kainico] incrementan la neurogénesis en el GD (Auvergne y col., 2002; Ekdahl y col., 2003; Parent y col., 1997; Radley y col., 2003) y en la VRM del sistema ZSV-BO (Parent y col., 2002). Sin embargo, no se ha identificado qué factores inducen neurogénesis en el cerebro epiléptico, y hasta ahora se desconoce si ésta tiene implicaciones patológicas o regenerativas. Como respuesta a la crisis epiléptica, las nuevas células participan en la reorganización anormal de las redes neuronales en el hipocampo (Parent y col., 1997). Además, se ha observado una localización ectópica de las neuronas recién generadas, las cuales se han encontrado en el hilus y la capa molecular interna (Scharfman y col., 2000). Estas células ectópicas, presentan propiedades electrofisiológicas (Scharfman y col., 2000, Scharfman y col., 2003] y morfológicas anormales (Ribak y col., 2003). Estos resultados sugieren que las neuronas que se generan en respuesta al status epiléptico, no contribuyen en la regeneración de la red neuronal y posiblemente generan nuevas crisis epilépticas. Además, el déficit neurológico que se observa después del status epiléptico, podría estar asociado a los circuitos aberrantes que se desarrollan (Parent, 2002; Sharfman, 2004).

ISQUEMIA CEREBRAL

Se ha demostrado que la isquemia cerebral incrementa la neurogénesis en el GD y en la ZSV del cerebro adulto [FIGURA 9] (Jin y col., 2001; Arvidsson y col., 2002; Yamashita y col., 2006). Este incremento se ha asociado con la activación del receptor NMDA (Arvidsson y col., 2001). Los precursores neuronales de la ZSV, migran a la zona isquémica del estriado adyacente (Arvidsson y col., 2002; Yamashita y col., 2006) y a través de la VRM y de la vía cortical lateral migran a la zona isquémica de la corteza cerebral (Jin y col., 2003) donde se diferencian y reemplazan las neuronas dañadas.

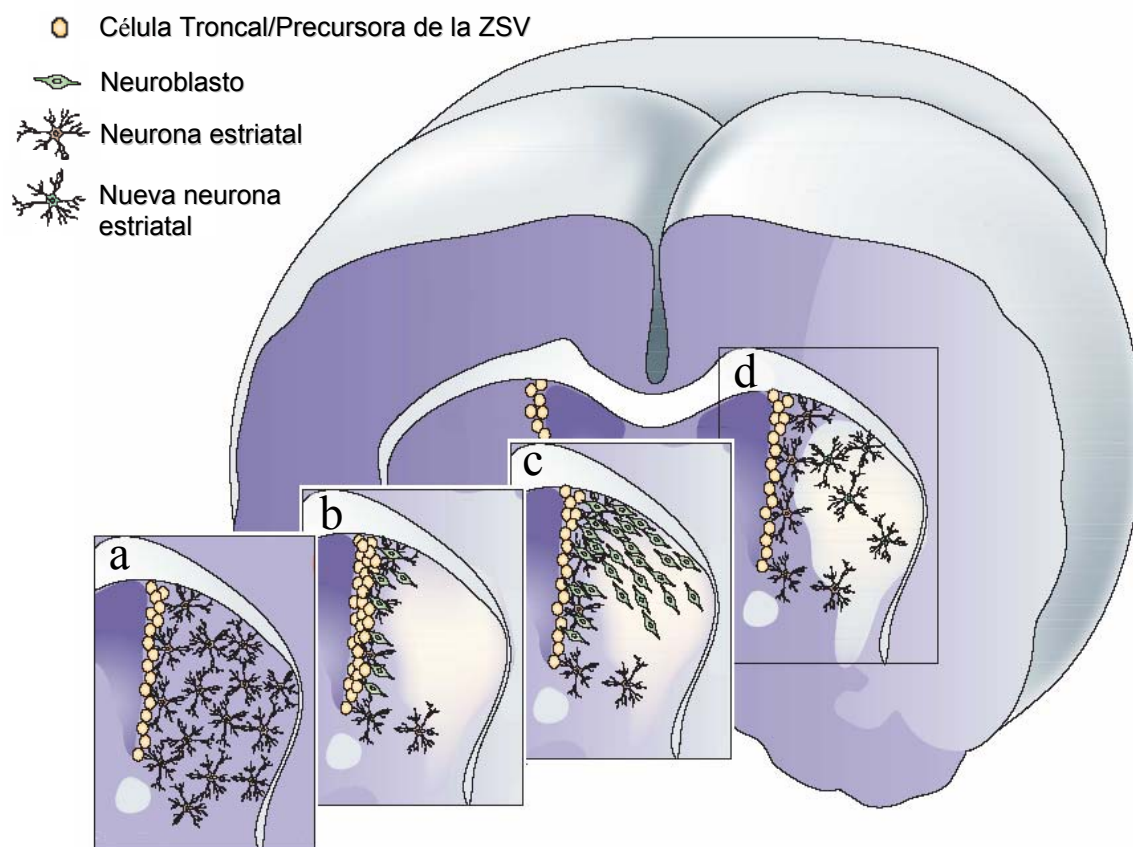


FIGURA 9 | **Neurogénesis en la ZSV en respuesta a la isquemia.** La figura ilustra la respuesta de las células troncales/precursoras de la ZSV a la oclusión de la arteria cerebral media. A: Estriado normal; B: Estriado isquémico; C: Migración de precursores; D: Reemplazo neuronal por precursores endógenos (modificado de Lidvall y col., 2004).

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

ENFERMEDAD DE PARKINSON

En la enfermedad de Parkinson [EP], las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* [SNc] degeneran, lo que trae como consecuencia un déficit de dopamina en sus áreas de proyección [principalmente el núcleo caudado y putamen] (Hornykiewicz, 2001). Al inducirse una depleción de dopamina experimentalmente en roedores, se presenta una disminución en la tasa de proliferación celular de la ZSV y del GD (Höglinger y col., 2004). Esta respuesta, se previene si administra ropinirole, un agonista del receptor D₂ de dopamina (Höglinger y col., 2004). La tasa de proliferación celular en la ZSV y el número de CPN en el GD y el BO, están disminuidas en cerebros *postmortem* de individuos que presentaron EP (Höglinger y col., 2004). Estas observaciones sugieren que la neurogénesis está disminuida en pacientes con EP debido al déficit de dopamina (Höglinger y col., 2004).

Por otro lado, hay evidencias experimentales contradictorias, las cuales indican que la SNc adulta mantiene mecanismos de reparación (Zhao y col., 2003). Este trabajo tenía como objetivo determinar si la SNc adulta era una zona neurogénica. Los resultados mostraron que las neuronas dopaminérgicas que mueren son reemplazadas en una proporción muy baja [20 nuevas células por día]. La tasa de reemplazo se duplica cuando se destruye parcialmente las neuronas dopaminérgicas mediante la administración de la neurotoxina 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina [MPTP]. Cabe mencionar que estos resultados no han sido reproducidos por otros autores (Frielingsdorf y col., 2004). Sin

embargo, si la neurogénesis se presenta en la SNc del humano tendría importantes aplicaciones clínicas, sobre todo en la estrategia de reemplazo celular y en la patogénesis de la EP. La evolución de este desorden podría ser determinado no sólo por la tasa de degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, sino también por la eficacia en la generación de nuevas neuronas (Zhao y col., 2003).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer [EA] es un trastorno neurodegenerativo progresivo. Las regiones cerebrales que se asocian a funciones mentales superiores, particularmente la neocorteza y el hipocampo son las áreas más afectadas. Histológicamente, se caracteriza por placas seniles que contienen depósitos extracelulares del péptido β -amiloide [$A\beta$], y por la formación intracelular de ovillos neurofibrilares integrados por proteína tau hiperfosforilada. Además, se ha demostrado la pérdida de sinapsis y neuronas piramidales.

Estudios realizados *in vivo*, indican que la administración de $A\beta$ reduce la proliferación de las CPN obtenidas de la ZSV y del GD (Haughey y col., 2002a,b). Sin embargo, en estudios *postmortem* se ha reportado un incremento en la neurogénesis del hipocampo en cerebros de pacientes que presentaron EA (Jin y col., 2004). Hasta ahora, se desconocen los factores moleculares que regulan la neurogénesis en esta enfermedad. Con base en los resultados publicados, podemos pensar que existen otros factores además de la $A\beta$ que regulan la neurogénesis en la EA (Jin y col., 2004).

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La Enfermedad de Huntington [EH] es un proceso neurodegenerativo que afecta al estriado, la corteza y el hipocampo. Estas alteraciones son responsables de los trastornos motores [corea y rigidez], cognitivos y psiquiátricos que presentan los pacientes con esta enfermedad. Se hereda con carácter autosómico dominante debido a una mutación en el gen de la huntingtina [una proteína de función desconocida] (Rosas y col., 2003). En un estudio *postmortem* realizado en cerebros de pacientes que presentaron EH, se reportó un incremento en la proliferación celular de la ZSV (Curtis y col., 2003). Hasta ahora, se desconoce si este incremento en la tasa de neurogénesis tiene implicaciones funcionales.

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 por segundo] en reposo. También destaca, la marcha festinante [arrastrando los pies], así como una postura flexionada y un equilibrio inestable (Langston y col., 1987).

Los defectos en la función motora se deben a una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* [SNc], una población de neuronas en el mesencéfalo que se proyectan hacia sus blancos en el estriado, principalmente el núcleo caudado y putamen, por lo que su muerte representa un déficit de dopamina en estas estructuras [FIGURA 10] (Horynekiewicz, 2001). En algunas neuronas que sobreviven, se observan inclusiones citoplasmáticas eosinófilas llamadas cuerpos de Lewy, formados por ubiquitina y alfa-sinucleína (Fahn., 1986; Spillantini y col., 2000).

Los síntomas de la enfermedad, aparecen cuando la pérdida de las neuronas dopaminérgicas excede el umbral crítico: 70–80% de las terminales dopaminérgicas en el estriado y 50–60% del perikarion en la SNc (Bernheimer y col., 1973). Una vez que aparecen los primeros síntomas, la muerte neuronal continua y los trastornos motores progresan lentamente (Morís y col., 1996; Lee y col., 1994). Diversos mecanismos compensatorios, retrasan la aparición de los síntomas (Bezard y col., 2003).

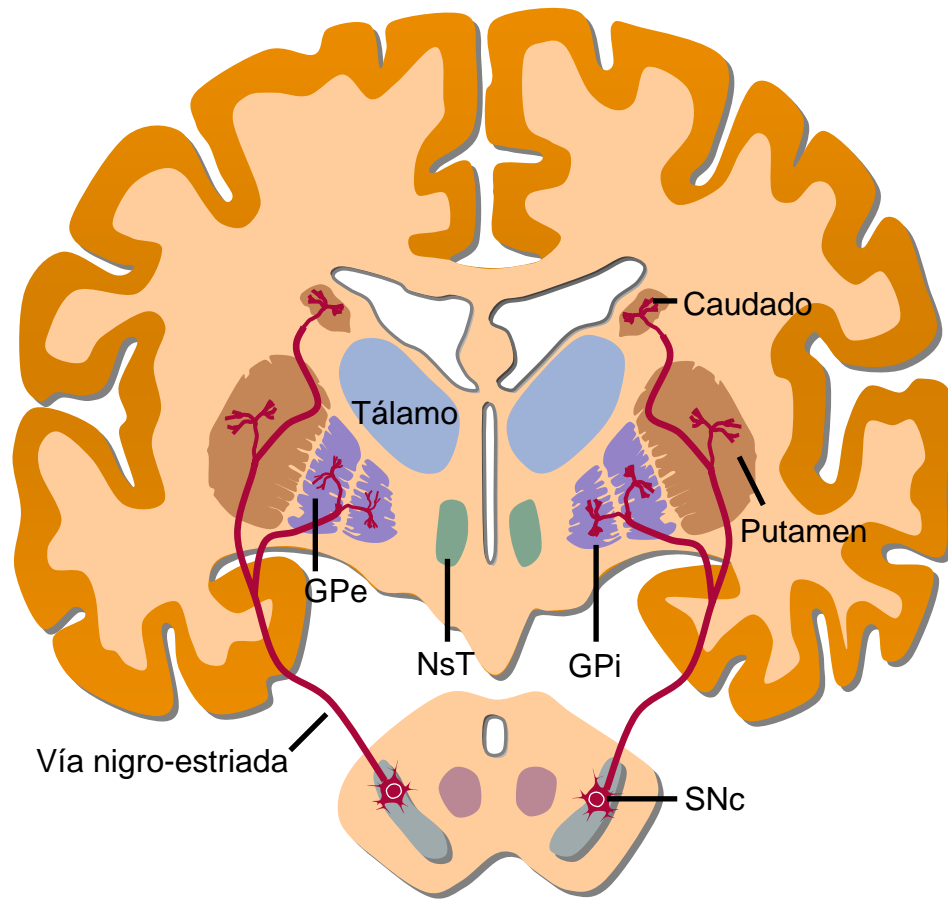


FIGURA 10 | Estructuras que integran a los ganglios basales en el cerebro humano. La mayoría de los componentes se hallan en el telencéfalo, aunque la sustancia nigra se encuentra en el mesencéfalo y el núcleo subtálmico está en el diencefalo. Las proyecciones de la sustancia nigra llegan al estriado, principalmente al núcleo caudado y putamen. GPe: segmento externo del globo pálido; GPi: segmento interno del globo pálido; SNc: zona compacta de la sustancia nigra; NST: núcleo subtálmico.

La degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, es un problema fundamental de 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 dopamina en el estriado, se presentan alteraciones en otros neurotransmisores como: noradrenalina, 5-hidroxitriptamina [5-HT], acetilcolina y ácido gamma-aminobutírico [GABA] (Horynekiewicz, 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.

TRATAMIENTO

Los primeros esfuerzos en el tratamiento de la EP se redujeron únicamente a una ayuda sintomática y en ciertos casos aislados a procedimientos estereotáxicos ablativos que interrumpían la desinhibición resultante del eje globo pálido - tálamo - corteza hacia las neuronas motoras.

A mediados de los años cincuenta, Arvid Carlson demostró que el 80% de la dopamina del cerebro se encuentra en los ganglios basales. Más tarde, Olen Hornykiewicz descubrió que el cerebro de los pacientes con EP tenía un déficit de dopamina en el estriado, sobre todo en el putamen. A principios de los años 60 se demostró que la EP se debe en gran parte a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En base a estos conocimientos, Walter Britkmayer y Olen Hornykiewicz advirtieron que la administración intravenosa de L-dihidroxifenilalanina [L-DOPA], la precursora de la dopamina, lograba una corrección llamativa, si bien breve, de los síntomas. La L-DOPA atraviesa la barrera hemato-encefálica y se metabolizada a dopamina en el estriado y de esa forma activa los receptores dopaminérgicos. Así, en 1967 George Cotzias demostró que la administración de cantidades gradualmente mayores de L-DOPA por vía oral podrían

conseguir una mejora significativa y continua de la EP. Aún cuando esta terapia proporcionó un significativo avance en el tratamiento farmacológico, incluso con el desarrollo de fármacos antiparkinsonianos más específicos, sólo se ha logrado controlar parcialmente algunos síntomas de la EP, mismos que comienzan a desaparecer al cabo de cinco años, al tiempo que se producen molestos efectos secundarios en forma de fluctuaciones de la respuesta motora y discinesias relacionadas con el fármaco.

La limitación y duración corta del tratamiento farmacológico llevaron al desarrollo de métodos alternativos. En 1979, se propuso como una nueva estrategia terapéutica, el reemplazo de las neuronas dopaminérgicas por trasplante celular, demostrándose con éxito en un modelo en rata de la EP (Björklund y Steveni, 1979; Perlow y col., 1979).

MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El desarrollo de modelos animales depende del conocimiento anatómico y fisiológico de la enfermedad. Una vez que se identificó que las neuronas de la SNc degeneran en los pacientes con EP, se han utilizado neurotoxinas selectivas para lesionar estas células (Ungeistedt y Arbuthnott, 1970; Sladek y Collier., 1988).

Modelo de la 6-hidroxidopamina

La 6-hidroxidopamina [6-OHDA] es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de la EP en roedores, dada su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas. La inyección estereotáxica de 6-OHDA en el haz nigro-estriado o en la sustancia nigra [SN], induce la destrucción unilateral de las neuronas dopaminérgicas [FIGURA 11] (Ungeistedt y Arbuthnott, 1970). Como resultado, los animales lesionados desarrollan una conducta rotatoria, la cual puede demostrarse farmacológicamente inyectando a los animales lesionados con agonistas dopaminérgicos. Por ejemplo, la administración de apomorfina activa los receptores supersensibles presentes en el lado lesionado del cerebro, induciendo que los animales presenten una rotación contralateral al lado de la lesión. En contraste, la administración de amfetamina, estimula la liberación de dopamina de las neuronas del lado sano del cerebro, por lo cual el animal rota de forma ipsilateral a la lesión. Esta conducta rotatoria se debe al desequilibrio que existe entre el contenido de dopamina en el estriado ipsilateral y contralateral a la lesión dopaminérgica, de tal forma que el animal rota siempre hacia el lado contrario del estriado dominante.

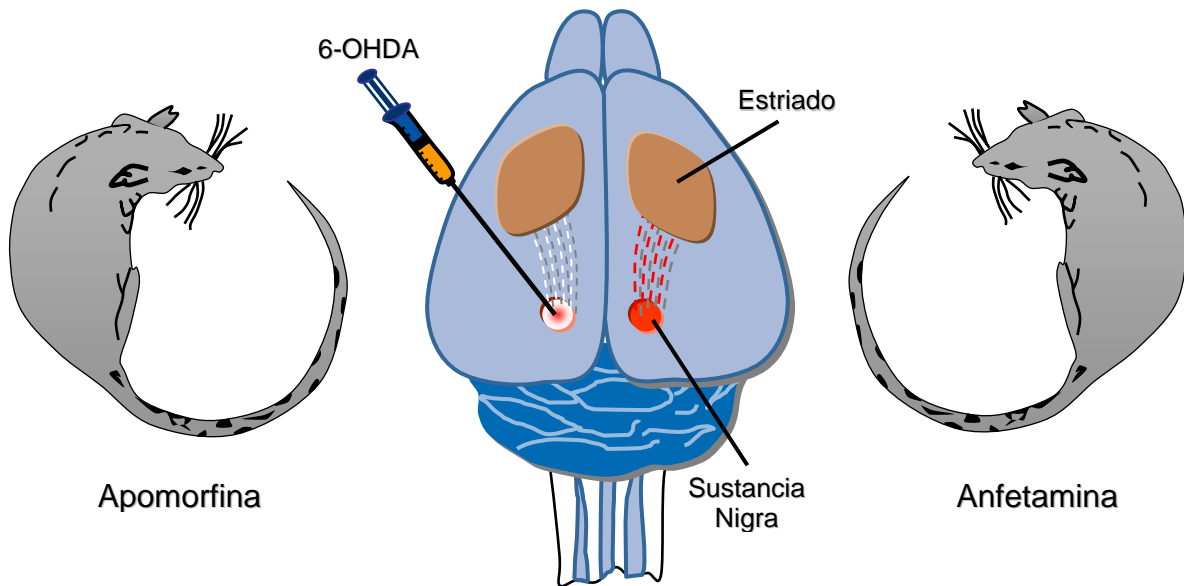


FIGURA 11 | Modelo animal de la 6-OHDA. La inyección unilateral de 6-OHDA en la sustancia nigra induce una degeneración irreversible en la vía nigroestriatal ipsilateral. Agonistas dopaminérgicos como la apomorfina inducen una conducta rotatoria contralateral al lado de la lesión. En contraste, cuando se les administra anfetamina se presenta una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión.

Modelo del 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina

Recientemente se ha empleado otra neurotoxina, la 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina [MPTP], un derivado de la petidina. Su inyección en primates, induce un síndrome motor y conductual muy parecido a la EP. La neurotoxicidad del MPTP se debe posiblemente a su metabolito MPP^+ , y a la afinidad de éste por la neuromelanina presente en las neuronas dopaminérgicas (Sladek y Collier., 1988).

ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL

Hace 26 años Merton y Morton demostraron que era posible estimular eléctricamente áreas motoras del cerebro humano utilizando estimulación eléctrica transcraneal [EET]. Ellos aplicaron un choque eléctrico breve de alto voltaje para activar la corteza motora e inducir potenciales motores evocados (Merton y Morton 1980). Este resultado aunque mostró potenciales aplicaciones clínicas tenía el problema de que la EET era muy dolorosa, dado que activa las terminales nerviosas presentes en la piel cabelluda. Cinco años mas tarde, Barker y col., demostraron que era posible estimular al cerebro utilizando estimulación magnética transcraneal [EMT], la cuál no generaba dolor (Barker y col., 1985). Actualmente, la EMT se emplea en la neurología clínica y en la investigación para estudiar la percepción, atención, aprendizaje, plasticidad, lenguaje y conocimiento (Hallet, 2000; Walsh y Cowey, 2000). Incluso ha demostrado ser una opción terapéutica y de estudio en trastornos del movimiento, epilepsia, depresión, ansiedad, trastornos del lenguaje y esquizofrenia (Cunnington y col., 1996; Walsh y Cowey, 2000).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Las primeras descripciones terapéuticas de la EMT se encuentran descritas en la antigua medicina egipcia (Breasted, 1930). De acuerdo a los registros históricos, se utilizaron piedras ferro-magnéticas sobre la cabeza de los pacientes para tratar diversas enfermedades. A fines del siglo XIX e inicios del siglo XX, se comenzaron a desarrollar dispositivos electromagnéticos y con ellos nuevas estrategias terapéuticas. El primer efecto

fisiológico debido a un campo magnético fue descrito por D'Arsonval en 1886, quien observó la aparición de fosfenos (destellos de luz 'percibidos' por un sujeto) y vértigo, cuando el individuo colocaba la cabeza en el interior de una bobina eléctrica con una frecuencia de descarga de 42 Hz, denominándose a este fenómeno 'magnetofosfeno'.

Posteriormente, Bickford y Fremming en 1965 reportaron la primera estimulación magnética no dolorosa de nervios periféricos en animales y humanos. Más tarde, Barker y col., propusieron el empleo de pulsos magnéticos de corta duración para obtener una velocidad de estimulación selectiva de los nervios periféricos del ser humano. Ellos desarrollaron un estimulador con potenciales aplicaciones clínicas, el cual era capaz de generar pulsos breves, que permitían obtener potenciales nerviosos y motores evocados, que podían ser registrados. En 1985, Barker y col., utilizaron un nuevo estimulador de alto voltaje, más eficaz en la transformación de energía desde el condensador hasta la bobina (obteniéndose un aumento del porcentaje de energía trasferida del 20 al 80%), el cual permitió que se realizara la primera estimulación magnética de la corteza motora en un ser humano [FIGURA 12]. Para ello, colocaron una bobina de estimulación de 100 mm de diámetro externo, centrada sobre el vértex de un sujeto sano, registrando el potencial de acción evocado en el abductor *digiti minimi* (localizado en la palma de la mano) por medio de electrodos de superficie. Lo importante fue que los individuos no describieron dolor, en contraste con el descrito durante la EET aplicada a la corteza cerebral, en la cual se fijaban electrodos a la piel cabelluda.

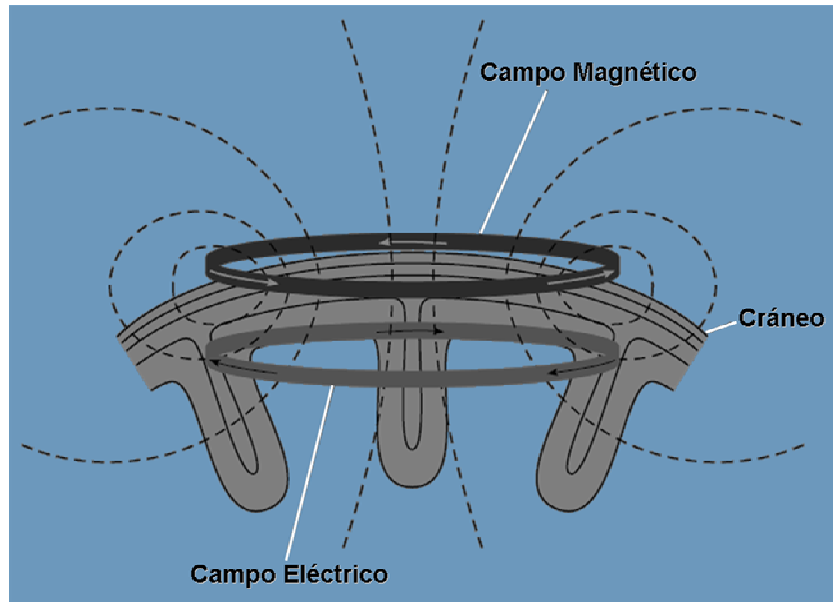


FIGURA 12 | **Estimulación Magnética Transcraneal.** Cuando se aplica la EMT, una corriente eléctrica pasa a través de una bobina de estimulación situada sobre la cabeza; la bobina genera campos magnéticos que fluyen a través de la piel cabelluda, el cráneo y las meninges, alcanzando al cerebro sin ser atenuados. El flujo magnético induce una corriente eléctrica en el tejido cerebral, el área estimulada depende de la forma y tamaño de la bobina de estimulación, de la fuerza (intensidad) del campo magnético, la frecuencia y la duración de los pulsos magnéticos producidos.

PRINCIPIOS FÍSICOS Y MECANISMO DE ACCIÓN

La EMT se basa en el principio de inducción electromagnética descrito por Michael Faraday en 1838. Un campo magnético variable en el tiempo puede inducir una corriente en un conductor cercano, de modo que la corriente inducida será proporcional a la rapidez de variación en el tiempo de la intensidad del campo magnético. El campo magnético es proporcional a la corriente que circula por la bobina de estimulación. Por tanto, la corriente inducida en el tejido (corriente secundaria) será proporcional a la velocidad de variación (es decir, la derivada en el tiempo) de la corriente en la bobina de estimulación (corriente

primaria). El voltaje de la corriente primaria y la geometría de la bobina de estimulación determinarán la amplitud y morfología del campo magnético originado, que, a su vez, determina la densidad y focalidad de la corriente secundaria inducida en el tejido. Podemos decir, que la EMT proporciona una vía de estimulación cortical sin electrodos, donde el campo magnético inducido actúa de puente entre la corriente primaria y la corriente secundaria.

La diferencia principal entre la estimulación eléctrica y la estimulación magnética es el modo en que se genera la corriente eléctrica en el organismo. Las cargas de un estimulador eléctrico son transportadas mediante un flujo de electrones, a través de un conductor, desde el estimulador hasta los electrodos de estimulación, y son transferidas a un flujo de iones en la interfase electrodo-tejido. Una pequeña fracción de la carga de estos iones puede ser transferida sobre membranas excitables y puede inducir una despolarización. En la estimulación magnética, un pulso de campo magnético fluye a través del cuerpo. Éste induce un campo eléctrico, una diferencia de voltaje entre dos puntos en el tejido, el cual, debido a que muchos de sus componentes presentan propiedades de conducción eléctrica, origina un flujo de corriente eléctrica. Si la amplitud y las características espaciales y de duración son adecuadas para originar una despolarización en la membrana de un nervio, se generará un potencial de acción [FIGURA 13].

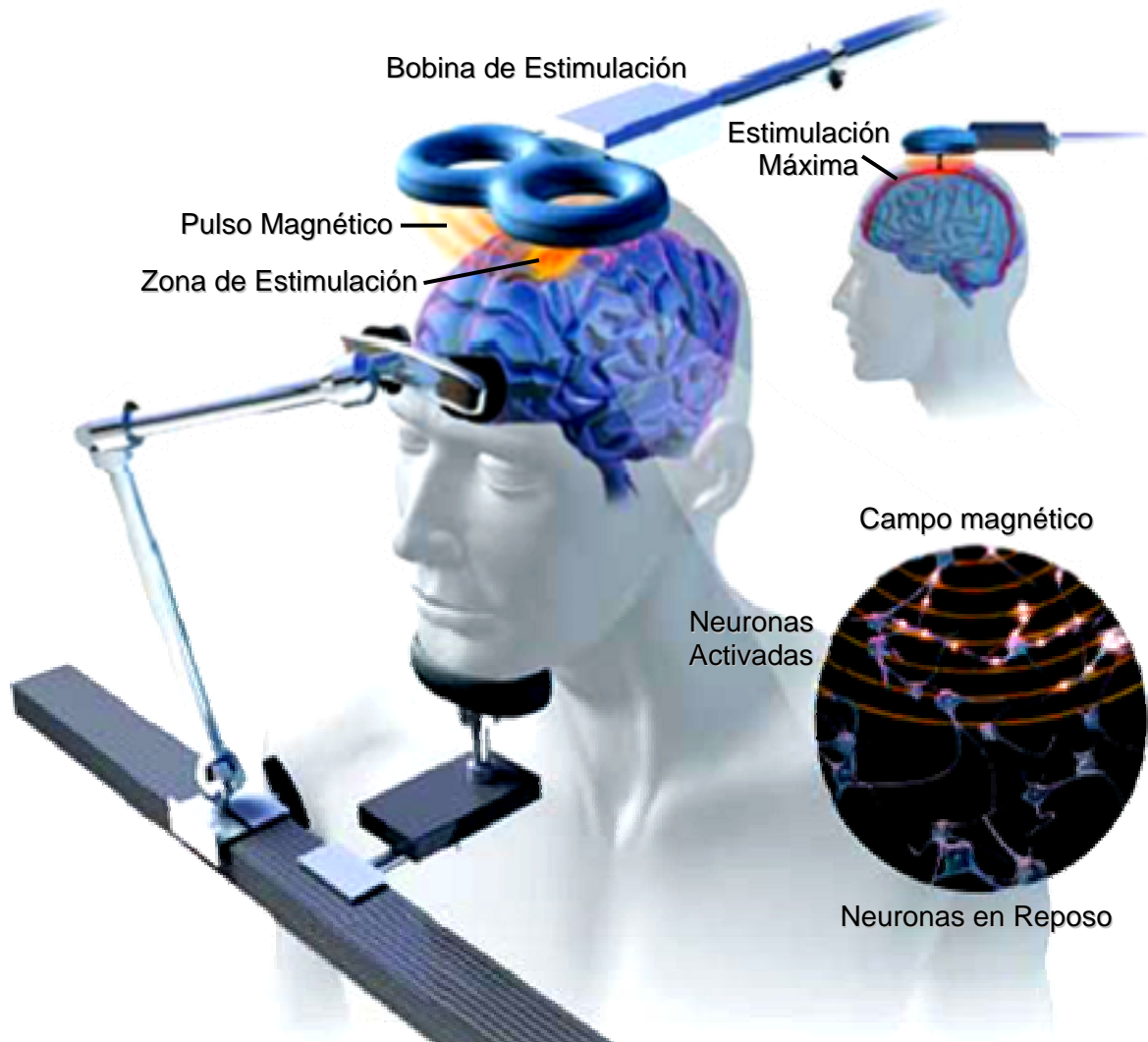


FIGURA 13 | El mecanismo de estimulación a nivel celular es el mismo para la estimulación magnética y eléctrica. En ambas técnicas las cargas fluyen al interior de una membrana celular electroexcitable, originando un cambio en el potencial transmembranal. Este cambio origina la despolarización de la membrana y el inicio de un potencial de acción, el cual se propagará a lo largo de la membrana mediante los mecanismos descritos en la conducción nerviosa.

En la actualidad se emplean pulsos magnéticos con un pico de intensidad que oscila entre 1 y 4 Teslas. El valor exacto de la intensidad del campo magnético depende de varios parámetros como son la geometría de la bobina de estimulación, y la profundidad y trayectoria de la estructura cerebral que ha de ser estimulada. Los estimuladores originales

fueron diseñados para producir ondas de morfología tal, que las señales inducidas en el tejido fueran similares en secuencia temporal a los cambios producidos por el balance de cargas eléctricas en los estimuladores, cuya efectividad estaba bien definida. Recientemente, como resultado de los trabajos de Pascual-Leone y Cadwell (Cadwell, 1991), se han desarrollado estimuladores magnéticos repetitivos en los que se omite la resistencia, y el diodo se cambia por un interruptor. De este modo, se origina un campo magnético oscilatorio, en contraposición a los campos magnéticos monofásicos que originaban los estimuladores convencionales. Los estimuladores de descargas oscilatorias tienen principalmente dos ventajas, ambas relacionadas con los requerimientos de energía.

Con base en los estudios realizados en la última década sobre los principios físicos de la EMT y de las bases neurofisiológicas de la misma, se distinguen dos tipos de aplicación: EMT simple (EMTs) y EMT repetitiva (EMTr). La EMTs hace referencia a la aplicación de estímulos únicos. La EMTr es la aplicación de estímulos regularmente repetidos a una misma zona de la corteza cerebral. Se establece la diferenciación entre EMTr ‘rápida’ o de alta frecuencia, cuando se utilizan frecuencias de estimulación por encima de 1 Hz; y EMTr ‘lenta’ o de baja frecuencia, cuando se utilizan frecuencias de 1 Hz o inferiores. Esta clasificación se basa tanto en los efectos fisiológicos como en el riesgo relativo de efectos secundarios de distintos parámetros de EMT (Pascual-Leone y col., 1996, 1997).

MECANISMO DE ESTIMULACIÓN

El punto de estimulación de una fibra nerviosa es aquel en que se produce el flujo de una cantidad de corriente por el axón a través de la membrana, suficiente como para originar una despolarización. Cuando se estimula mediante electrodos de superficie, se asume que la estimulación tiene lugar inmediatamente debajo del cátodo. En el caso de la estimulación magnética, el lugar exacto en el que se produce la estimulación no está definido de una forma tan clara, y depende de una serie de factores. Si un nervio se sitúa en la proximidad de la bobina, éste experimentará la inducción de una corriente transmembranal, la cual tenderá a originar una despolarización en una región del nervio que podríamos llamar 'A', y una hiperpolarización en otra región 'B'. Estas regiones podrían considerarse, por analogía a la estimulación eléctrica, un 'cátodo virtual' y un 'ánodo virtual', respectivamente.

El cerebro es una estructura tridimensional, razón por la cual no se puede aplicar el mismo razonamiento del cable cuando se le aplica la EMT. Por ello, al estudiar los efectos de la EMT en estructuras biológicas complejas, se habla de 'densidad de corriente'; es decir, de la cantidad de corriente que fluye a través de una unidad de área del conductor. Las unidades de densidad de corriente pueden ser amperios por milímetro cuadrado (A/mm^2), o amperios por centímetro cuadrado (A/cm^2).

Al revisar las propiedades generales del flujo de una corriente inducida en un conductor de morfología arbitraria se observa cómo las líneas de actividad se dirigen hacia

la periferia con un gradiente de intensidad decreciente hasta ocupar la totalidad del volumen del conductor. Se considera que existe una buena focalidad, o que un estímulo es focal, cuando circula una intensidad de corriente alta a través de la diana de estimulación, al tiempo que circula una corriente de intensidad baja alrededor de la misma. Podemos considerar que la focalidad depende de la configuración del conductor y de la forma, orientación y tamaño de la bobina de estimulación (Cohen LG y col., 1990; Cohen D y col., 1991).

El flujo de las corrientes inducidas en el cerebro mediante EMT resulta paralelo al plano de la bobina de estimulación, y es prácticamente paralelo a la superficie de la corteza cerebral, cuando la bobina de estimulación se sitúa tangencialmente respecto al cráneo. Se ha postulado, por tanto, que la EMT activará elementos neuronales situados horizontalmente, paralelos a la superficie cerebral, a diferencia de las estructuras activadas mediante estimulación eléctrica (Rothwell, 1991). La mayoría de los elementos neuronales intracorticales orientados horizontalmente son interneuronas, lo que induce a pensar que la activación de vías descendentes se produciría transinápticamente, originando ondas indirectas. Otras hipótesis apuntan que la diferencia en los mecanismos de estimulación, eléctrica y magnética, podría residir en el hecho de que el estímulo magnético actúa sobre las mismas estructuras que la estimulación eléctrica, pero a un nivel mucho más superficial.

La documentación de una evidente focalidad no significa que el efecto de la estimulación esté limitado a las estructuras intracorticales, activadas de forma directa. Más bien debería contemplarse, en función de los hallazgos experimentales, la posibilidad de una transmisión transináptica del estímulo, que alcanzará estructuras corticales y

subcorticales distales al punto de estimulación. Paus y col., realizaron un estudio combinando, utilizando ^{15}O -PET y EMTr sobre la corteza prefrontal, demostrando el efecto transináptico de la EMT (Paus y col., 1997).

SEGURIDAD E INOCUIDAD DE LA EMT

La seguridad de la EMT está avalada por la larga experiencia derivada de los estudios con estimulación eléctrica cortical en animales y humanos, así como en estudios específicos en materia de seguridad, utilizando EMT en humanos. La experiencia acumulada desde 1985 sugiere la ausencia de efectos adversos colaterales, derivados de la aplicación de pulsos simples en sujetos normales, aunque podría inducir crisis epilépticas en sujetos predispuestos. Sin embargo, la EMTr podría ocasionar dolores de cabeza, cambios temporales del umbral de estimulación, acúfenos y, en presencia de electrodos superficiales, quemaduras en la piel. Se ha descrito además, como complicación más relevante de la EMTr, la posibilidad de inducir crisis epilépticas en pacientes con epilepsia e, incluso, en sujetos normales. Estas crisis epilépticas son aisladas y no originan ningún tipo de secuela, no ocasionan la aparición de ningún foco epiléptico, ni requieren atención específica posterior, más que la derivada de la misma crisis en el momento de producirse. Se han llevado a cabo estudios con el propósito de conocer y profundizar en los mecanismos que conducen a este fenómeno, y determinar los parámetros de estimulación (intensidad, frecuencia, duración de los trenes, número de trenes, intervalos entre trenes) que se consideran seguros, libres de riesgo de inducir una crisis en sujetos sanos normales no predispuestos, y aquellas situaciones que pueden incrementar el riesgo potencial de la

EMTr. En 1996 tuvo lugar una reunión internacional de expertos en EMT en los Institutos Nacionales de Salud en Estados Unidos que generó recomendaciones sobre la utilización adecuada de la EMT, tras revisar la evidencia acumulada de riesgos y efectos adversos potenciales. Se han propuesto una lista de contraindicaciones absolutas y relativas de la misma, así como una serie de recomendaciones destinadas a incrementar al máximo la seguridad y prevención de posibles eventualidades (Wassermann, 1998).

Por otra parte, la exposición a EMT no produce ningún tipo de alteración de tipo cognitivo, neurológico, ni físico, ya sea a corto o largo plazo (Wassermann 1998; Pascual-Leone y col., 1993). El paso de la corriente a través de la bobina de estimulación genera un leve artefacto acústico que, en función de la sensibilidad acústica individual y de la frecuencia e intensidad de estimulación, puede resultar molesta, tanto para el sujeto, como para el experimentador. Este fenómeno no deriva en el deterioro de la capacidad auditiva de los sujetos expuestos a EMT, observándose tan sólo cambios temporales en los umbrales del audiograma, y tinnitus transitorios en sujetos expuestos a altas frecuencia de EMTr, por encima de 25 Hz. Este fenómeno se atenúa, mediante la utilización de tapones en los oídos, lo que garantiza la seguridad de la EMT cuando es aplicada dentro de los parámetros definidos en las normas de seguridad (Pascual-Leone y col., 1992).

Por último, la inocuidad a nivel celular y ultraestructural de la EMT ha sido ampliamente estudiada, tanto en animales de experimentación como en sujetos que iban a ser sometidos a intervenciones de neurocirugía y fueron sometidos previamente a EMTr. Los estudios anatomopatológicos realizados no han sido capaces de detectar ningún tipo de

alteración, ni en los tejidos de los sujetos intervenidos, ni en los tejidos procedentes de animales de experimentación.

APLICACIONES CLÍNICAS

Una de las herramientas recientemente incorporada a la neurociencia es la EMT. Se trata de una técnica segura y no dolorosa que permite estimular la corteza cerebral del ser humano. Desde que Barker y col., desarrollaron en 1985 el primer estimulador compacto, la utilización de pulsos magnéticos simples ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio de las vías motoras centrales, tanto en pacientes como en sujetos sanos. El desarrollo en 1987 de estimuladores magnéticos capaces de generar estímulos repetitivos a frecuencias de hasta 60 Hz ha expandido notablemente las aplicaciones de la EMT en el campo de la neuropsicología y la neurociencia cognitiva (Pascual-Leone y col., 1997; Hallett 2000; Walsh y Cowey 2000).

La EMT se ha empleado principalmente en el estudio de correlatos fisiológicos de funciones cognitivas. Existen numerosos estudios que se basan en las siguientes aplicaciones: 1) Pulsos simples de EMT para comprobar la excitabilidad de las redes neuronales. Esto permite realizar comparaciones del nivel de activación de diferentes estructuras cerebrales en distintos momentos, durante la realización de una determinada tarea; 2) Pulsos simples de EMT, apropiadamente aplicados en el tiempo y en el espacio, pueden bloquear de manera transitoria la función de redes neuronales; 3) La EMT puede ser aplicada de modo focal para realizar una cartografía de la representación cortical de los

músculos contralaterales. Se puede además, obtener mapas distintos, en diferentes momentos y en un mismo sujeto, lo que permite estudiar la plasticidad neuronal asociada con la recuperación de funciones después de lesiones centrales y o periféricas, y el estudio y seguimiento de la representación cortical de esos músculos durante la adquisición de nuevas habilidades motoras; 4) Pulsos pareados para estudiar y medir la excitabilidad de estructuras corticales y el grado de inhibición córtico-cortical, lo cual representa un importante avance en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones del control motor, así como la investigación del efecto de diferentes fármacos sobre la excitabilidad cortical; 5) El empleo de trenes de pulsos magnéticos, conocido como EMTr, permite el bloqueo funcional, selectivo y transitorio de las redes neuronales responsables de diversas funciones cognitivas y motoras; 6) También se ha utilizado la aplicación de la EMTr como herramienta en la modulación del nivel de excitabilidad cortical transitoria, abriendo la posibilidad de convertir esta técnica, hasta ahora exploratoria y diagnóstica, en una herramienta terapéutica, en diferentes patologías que cursan con hipo-o hiperfunción cortical.

Las primeras aplicaciones clínicas de la EMT como agente terapéutico potencial para la enfermedad de Parkinson (EP) fueron realizadas por Pascual-Leone y col., en 1994. Ellos observaron que al usar EMTr (5 hz) en seis pacientes con EP, con una intensidad del 90% del umbral de reposo de un potencial evocado (PE), en la corteza motora contralateral de la mano con la cual se realizaba la prueba de Grooved Pegboard (usada para medir la velocidad psicomotora, en la cual los pacientes con EP tienen gran dificultad), mostraban una mejoría en los tiempos de ejecución de la prueba. Esta mejoría era más notoria en los pacientes que estaban sin medicación. Por otro lado, Ghabra y col., intentaron replicar el

mismo estudio en 11 pacientes, sin encontrar ningún efecto benéfico (Ghabra y col., 1999). Por el contrario, en algunos pacientes -con una intensidad de 90%-, se evidenció la presencia de movimientos anormales, que impidieron la realización de la prueba. Este fenómeno se ha replicado en otros estudios, e inclusive se ha hecho con menores intensidades, viéndose que desaparece el temblor inducido por la EMT, pero sin mejoría en el tiempo de ejecución de la prueba (Topka y col., 1999). Otro estudio realizado por Tergau y col., utilizando EMTr en siete pacientes medicados con EP, y utilizando la sección motora del Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) (que mide la velocidad de marcha y el tiempo de reacción motora simple) no encontraron efectos benéficos ni reacciones adversas (Tergau y col., 1999).

Por otra parte, la EMTr de baja frecuencia es capaz de normalizar los niveles de excitabilidad de la corteza motora cuando éstos se hallan patológicamente aumentados, en pacientes con distonía, alcanzando una mejoría sintomática por un espacio de tiempo de horas, incluso días. Se podrían emplear argumentos similares para estudiar los efectos de la EMTr de la corteza orbitofrontal en trastornos obsesivocompulsivos (Greenber y col., 1997), de la EMTr sobre la corteza suplementaria motora en los tics, de la corteza motora en mioclonías corticales, o de la EMTr de un foco epiléptico, estudiando la variación en la frecuencia de las puntas y de las crisis en epilepsias focales. Todos estos estudios nos sitúan en disposición de pensar que, aún en los casos en que los efectos mostraran una duración o vida media excesivamente corta o variable, sería posible alcanzar una eficacia mayor del tratamiento farmacológico mediante su combinación con EMTr.

La duración de los efectos de la EMTr sobre la sintomatología en todas estas situaciones genera preguntas interesantes respecto al mecanismo de acción. Un efecto sostenido que se prolonga por espacio de semanas e incluso meses no puede ser explicado exclusivamente desde los efectos moduladores de la EMTr sobre la excitabilidad cortical. Parece razonable asumir que los efectos de la EMTr no se localizan de manera exclusiva en la corteza directamente afectada por la EMTr, sino que producen un efecto mucho más amplio implicando otras estructuras, corticales y subcorticales, de forma transináptica. Los estudios combinados utilizando EMTr, PET y SPECT apoyan esta idea. Podría postularse que, además de la extensión de los efectos a redes neuronales corticales y subcorticales, la EMTr induce la expresión de genes que podrían desempeñar un papel importante en una cascada de eventos, que podrían redundar en un mantenimiento de los efectos observados a nivel emocional y conductual.

TERAPIA CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El trasplante intracerebral se define como el implante de tejido vivo neuronal o no neuronal en el sistema nervioso central [SNC] de un huésped. El primer trasplante de tejido nervioso fue reportado por W. Gilman Thompson en 1890. El análisis histológico del tejido trasplantado, fue el principal objetivo de los estudios, durante los siguientes 70 años [TABLA I]. Una nueva etapa en esta investigación comenzó en la década de 1960, cuando se describieron sus efectos funcionales, primero en reemplazos hormonales (Halász y col., 1965) y posteriormente en un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson (Björklund y Steveni, 1979; Perlow y col., 1979). Poco después, se demostró la recuperación del ritmo circadiano, inducido por el trasplante del núcleo supraquiasmático (Drucker-Colín y col., 1984), así como la reversión del hipogonadismo determinado genéticamente en un ratón mutante, a consecuencia del trasplante heterotópico de bulbo olfatorio accesorio (Perlow y col., 1987). Estudios recientes han demostrado que el tejido nervioso trasplantado sobrevive, se integra en el cerebro del huésped e induce una recuperación funcional en modelos animales de diversas enfermedades neurodegenerativas humanas, como la enfermedad de Parkinson, Huntington, Alzheimer y narcolepsia (Koutouzis y col., 1994; Lindvall y col., 2004; Arias-Carrión y col., 2004, 2006).

El trasplante de tejido generalmente se realiza en fragmentos, o bien como células disociadas. Los sitios que con mayor frecuencia se utilizan para realizar los implantes en el encéfalo son el parénquima cerebral [trasplante intraparenquimatoso] y sistema ventricular [trasplante intraventricular] (Drucker-Colín y Verdugo-Díaz., 2004).

TABLA I. HISTORIA DE LOS TRASPLANTES INTRACEREBRALES EN MAMÍFEROS

I. ESTUDIOS ANATÓMICOS

1890 W.G Thompon (USA)	Primer trasplante de tejido nervioso al cerebro adulto
1907 G. del Conde (Italia)	Primer trasplante de tejido embrionario al cerebro adulto
1909 W. Ranson (USA)	Primer trasplante de ganglios espinales al cerebro adulto
1911 F. Tello (España)	Primer trasplante de nervio periférico al cerebro adulto
1917 E. Dunn (USA)	Primer trasplante de tejido nervioso neonato a cerebro neonato
1921 Y. Shirai (Japón)	Primera demostración del cerebro como un sitio inmunológicamente privilegiado
1940 W.E Le Gross Clark (Inglaterra)	Primer trasplante de tejido nervioso fetal al cerebro neonato
1957 B. Flerko y J. Szentagothai (Hungria)	Primer trasplante intraventricular de tejido endocrino

II. ESTUDIOS FUNCIONALES

1965 B. Halász y col., (Hungria)	Primer reporte de recuperación hormonal después de trasplante neuroendocrino
1979 A. Björklund y U. Stenevi (Suecia)	Primer trasplante de tejido fetal demostrando recuperación motora en lesiones de la vía nigroestriatal
1979 M. Perlow y col., (USA)	
1981 W.J. Freed y col., (USA)	Primer trasplante de tejido suprarrenal que demuestra la recuperación motora en animales con lesión de la SNc
1984 R. Drucker-Colín y col., (México)	Trasplante de núcleo supraquiasmático fetal que induce recuperación del ritmo circadiano
1987 M.J. Perlow y col., (USA)	Trasplante heterotópico fetal de bulbo olfatorio accesorio que revierte el hipogonadismo determinado genéticamente en un ratón mutante

Considerar al SNC como un sitio “inmunológicamente privilegiado”, ha caracterizado al cerebro como un órgano donde el sistema inmune tiene pocas posibilidades de atacar al tejido trasplantado (Shirai., 1921; Fisher y Gage., 1993). Este hecho confiere mayores posibilidades de que el implante sobreviva y se integre en el cerebro del huésped (Winkler y col., 2005).

La sobrevivencia del tejido implantado, también está relacionada con la edad del donador (Seiger y Olson., 1997). Generalmente, el tejido embrionario sobrevive por más tiempo que el obtenido de recién nacidos o adultos. La edad del receptor, el sitio y la técnica de trasplante utilizada son otros factores importantes para su sobrevivencia (Poltorak y col., 1992).

Después de 116 años de estudios y el uso de diversos tipos de tejidos implantados en cerebros normales o dañados, se ha demostrado la viabilidad de las células trasplantadas, así como la recuperación parcial de diversas alteraciones clínicas y conductuales. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre trasplante en el SNC, se han enfocado en la enfermedad de Parkinson.

TRASPLANTE CELULAR EN EL MODELO ANIMAL DE LA 6-OHDA

Desde su inicio, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre trasplantes de tejido nervioso, tanto clínicos como básicos, se han relacionado con la EP. Varios experimentos han caracterizado el tejido dopaminérgico trasplantado, su habilidad para formar conexiones ínter neuronales complejas, así como su capacidad para corregir el déficit de dopamina en el estriado lesionado (Fine y col., 1998).

Perlow y col., [1979] implantaron sustancia nigra fetal en cerebros de ratas adultas, lesionadas con 6-OHDA. Ellos observaron una mejoría significativa en el déficit motor de las ratas implantadas. Otros investigadores reportaron resultados similares con otras técnicas y tejidos (Lindvall, 1989; Oyesiku y Bakau, 1993). Freed y col., [1981] realizaron el autotrasplante de médula suprarrenal, observando una recuperación funcional en los animales trasplantados.

En la década de los 80's, la mayoría de los estudios realizados, utilizaron como estrategia para inducir la recuperación de la asimetría motora, tejido o células cultivadas obtenidas de la médula suprarrenal y sustancia nigra fetal, así se demostró una superioridad funcional de la sustancia nigra fetal con respecto a las células de la médula suprarrenal. Sin embargo, las desventajas sociales y éticas de este tipo de donación que aún persisten en la clínica, impidieron su uso con mayor frecuencia. Por ello, el tejido obtenido de la médula suprarrenal demostró una mayor disponibilidad, además de sus ventajas inmunológicas, por lo que se desarrollaron rápidamente ensayos clínicos. La idea de utilizar médula suprarrenal

en este modelo de EP, se basó en el conocimiento previo de que las células cromafines producen y liberan cantidades importantes de catecolaminas (Freed y col., 1981).

Posteriormente, se demostró que la recuperación motora también se observa, si el trasplante se realiza en el ventrículo contralateral al lado lesionado, aunque requiere un mayor tiempo (Mendoza-Ramirez y col., 1991). Esto sugirió que el trasplante tiene efectos a distancia, lo que se demostró posteriormente con estudios autoradiográficos (Zainos-Rosales y col., 1993).

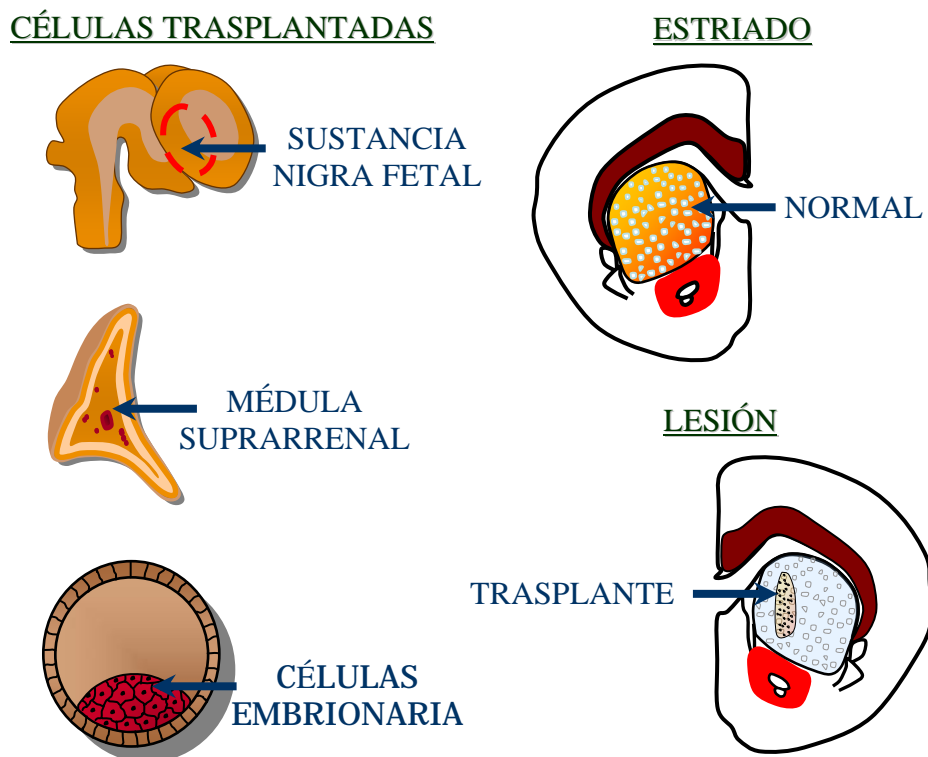


FIGURA 14 | Terapia celular en el modelo animal de la 6-OHDA. La figura ilustra las principales líneas celulares utilizadas para revertir la asimetría motora inducida por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

Recientemente, se ha utilizado tejido nervioso periférico, células tumorales encapsuladas, líneas celulares modificadas genéticamente (Levivier y col., 1995) y células troncales embrionarias (Börklund y col., 2002; Holden, 2002; Kim y col., 2002). Sin embargo, está claro que no importa que tipo de tejido se utilice como material para el implante, el déficit motor se reduce solo parcialmente.

TRASPLANTES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON

La aplicación clínica de los trasplantes neuronales se ha enfocado principalmente en la EP (Olanow y col., 1996). Otras patologías, en las cuales se han realizados trasplantes en humanos son: enfermedad de Huntington (Sanberg y Norman, 1998), dolor crónico (Wang y Segen, 1994), y esquizofrenia (Kolarik y col., 1988),

El trasplante se ha considerado una alternativa racional como tratamiento para los pacientes con EP porque: [i] La EP se asocia con una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNC; [ii] La terapia de reemplazo dopaminérgico proporciona beneficios clínicos considerables; [iii] Hay un área bien definida para realizar el trasplante; y [iiii] Los implantes de células dopaminérgicas mejoran parcialmente la conducta observada en los modelos animales de la EP. Hasta ahora, los dos tejidos más utilizados para el trasplante en humanos con EP son: células cromafines de la médula suprarrenal y mesencéfalo fetal.

TRASPLANTES DE MÉDULA SUPRARRENAL

Los primeros pacientes con EP que recibieron trasplante autólogo de médula suprarrenal tuvieron una pobre respuesta (Backlund., y col., 1985). Posteriormente, el trasplante se puso en contacto con el líquido cerebroespinal [LCE], lo que incrementó probablemente la sobrevida del implante e indujo una mejoría considerable de la rigidez y la acinesia (Madrazo y col., 1987), esta mejoría persistió un año después de la cirugía (Drucker-Colín y col., 1988). Este procedimiento propuesto en México, ha sido utilizado por varios grupos en el mundo, obteniendo resultados variables [TABLA II] (Allen y col., 1989; Goetz y col., 1989; Kelly y col., Penn y col., 1988).

Diferentes cambios clínicos se han descrito en un número considerable de pacientes con EP que han recibido trasplante de médula suprarrenal (Goetz, 1992; López-Lozano y col., 1991). Esta mejoría clínica desaparece después de 1 a 2 años del trasplante (Drucker-Colín y col., 1988). Los resultados de la autopsia realizada a algunos pacientes trasplantados, ha revelado que las células trasplantadas sobreviven en el sitio del implante (Hurning y col., 1989; Jankovic y col., 1989; Waters y col., 1990; Date y col., 1996).

TABLA II. TEJIDOS TRASPLANTADOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS EN PACIENTES CON EP

Características	
I. Médula Suprarrenal	
Madrazo y col., (1987) Drucker-Colín y col., (1988) México	Primer trasplante de médula suprarrenal implantada con éxito en pacientes con EP. Mejoría marcada de los trastornos motores por 1 año
Hurtig y col., (1989) USA	Análisis postmortem de un paciente con autotrasplante de médula suprarrenal
Kordower y col., (1991) USA	Demuestra que las células cromafines sobreviven después del autotrasplante de médula suprarrenal
López-Lozano y col., (1991) España.	Perfusión de médula suprarrenal implantada en el núcleo caudado de pacientes con EP
Olson y col., (1991) Suecia	Infusión intraperitoneal de NGF y autotrasplante de médula suprarrenal en paciente con EP (1 año)
López-Lozano y col., (1992) España	Autotrasplante intraestriatal de co-cultivo de médula suprarrenal con nervio periférico en pacientes con EP
Goetz (1992) USA	Mejoría de los trastornos motores a largo tiempo (4 años) después del trasplante de médula suprarrenal
Drucker-Colín y col., (1999) México	Mejoría de los trastornos motores en una paciente implantada mediante cirugía estereotáxica de células cromafines diferenciadas en cultivo con campos magnéticos (7 meses) y seguimiento con tomografía por emisión de positrones (PET-scan).
II. Tejido Fetal	
Madrazo y col., (1990) México	Mejoría de los trastornos motores y descenso en la dosis de L-DOPA en 7 pacientes con microcirugía unilateral (6-19 meses)
Lindvall y col., (1990) Suecia	Mejoría marcada de los trastornos motores en 2 pacientes con implante bilateral mediante cirugía estereotáxica (22-24 meses)
Sawle y col., (1992) Suecia	Estudio con PET-scan en 2 pacientes con trasplante de neuronas dopaminérgicas implantadas en el putamen
Freed y col., (1992) USA	Mejoría a largo plazo de los trastornos motores y reducción de los requerimientos de L-DOPA en pacientes con EP severa, después del implante de tejido embrionario mesencefálico (5-45 meses)
Deacon y col., (1997) USA	Xenotrasplante de neuronas dopaminérgicas fetales de cerdo implantadas en pacientes con EP (7 meses)
López-Lozano y col., (1997) España	Mejoría a largo plazo de 10 pacientes con implante fetal de mesencéfalo ventral (5 años)
III. Otros tejidos	
Itakura y col., (1997) Japón	Autotrasplante de ganglio simpático en 35 pacientes con EP. Mejoría en los trastornos motores (3 años)
Freed y col., (2001) USA	Primer estudio doble ciego, utilizando placebo versus tejido dopaminérgico fetal en 20 pacientes. Mejoría de los trastornos motores (1 año)

TRASPLANTE DE TEJIDO FETAL

Las técnicas utilizadas para el trasplante de tejido fetal son: microcirugía abierta y cirugía estereotáxica (Madrazo y col., 1990; Freed y col., 1990, 1992; Hitchcock y col., 1990; Lindvall y col., 1990). El tejido fetal en todos los casos se ha obtenido de abortos electivos. Estos estudios han mostrado que las células fetales implantadas en el cerebro de pacientes con EP sobreviven y maduran 8 años después de la cirugía, ayudando a mejorar el temblor debilitante de la enfermedad [ver tabla II].

A pesar de la mejoría funcional observada con trasplante fetal, el uso en humanos de tejido nervioso embrionario crea varios problemas, en particular, la dificultad para adquirir tejido suficiente para el implante [6-12 fetos por paciente], así como todos los problemas éticos asociados con el uso de tejido fetal humano obtenido de abortos (Barrer, 2002). En la mayoría de los países, el uso de este tejido no se permite o existen muchas restricciones.

En resumen, como se observa en la tabla II, desde los reportes mexicanos realizados a finales de los años ochenta hasta la fecha, han sido trasplantados aproximadamente unos 500 pacientes con EP en todo el mundo, y de ellos se ha obtenido un promedio de 30-40% de resultados benéficos, el resto ha tenido efectos nulos o una mejoría modesta. Los resultados en general sugieren que los trasplantes celulares al sistema nervioso son una alternativa en el tratamiento de la EP. Sin embargo, aún es necesario realizar más estudios

experimentales y clínicos con el fin de ensayar nuevas técnicas de trasplante y/o de tipos celulares a implantar para lograr una mejor recuperación clínica.

CÉLULAS CROMAFINES COMO MATERIAL DE TRASPLANTE

Con base en estos resultados, se continúan desarrollando métodos para que las células de la médula suprarrenal se utilicen como una fuente de células dopaminérgicas (Date, 1996; Drucker-Colín y col., 1999). Algunas de estas estrategias, van dirigidas a incrementar la sobrevivencia del implante proporcionando factores de crecimiento y/o realizando co-trasplantes con tejidos que proporcionen factores tróficos (Date, 1996).

Respecto a las células cromafines [CCs] presentes en la médula de la glándula suprarrenal, se conoce que poseen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en células tipo neuronal conservando su naturaleza catecolaminérgica (Unsicker y col., 1978; 1984). Esta diferenciación se incrementa cuando se cultivan en presencia de factor de crecimiento neuronal [NGF] (Tischler y col., 1982). Además, se ha reportado que otros procedimientos inducen efectos similares a los observados con NGF (Robinson, 1985). La estimulación con campos magnéticos de extrema baja frecuencia [CM-EBF, <100 Hz; Lacy-Hulbert y col., 1998] también induce la diferenciación neuronal de las CCs (Drucker-Colín y col., 1994). Las CCs tratadas con CM-EBF presentan extensiones neuríticas con varicosidades y numerosos neurotúbulos (Feria-Velasco y col., 1998).

Los niveles de catecolaminas determinados por cromatografía líquida de alta resolución [HPLC] *in vitro* muestran que las CCs tratadas con CM-EBF liberan más dopamina que las no tratadas, las CCs no tratadas liberan más adrenalina, en ambos casos la liberación de noradrenalina no cambió (Verdugo-Díaz y col., 1998). La entrada de Ca^{2+} a través de canales voltaje dependientes tipo-L, es responsable del crecimiento de los procesos neuríticos mediados por CM-EBF (Morgado-Valle y col., 1998), lo cual se demostró al inhibir su desarrollo con nifedipina [bloqueador específico de los canales tipo-L de Ca^{2+}], mientras que la administración de Bay K-8644 [agonista de los canales tipo-L de Ca^{2+}] incrementó el porcentaje de células tipo neuronal, además de aumentar la longitud de las extensiones neuríticas en presencia de CM-EBF.

La capacidad de las CCs para diferenciarse en células tipo neuronal al ser expuestas a CM-EBF, se ha demostrado en CCs de ratas recién nacidas (Drucker-Colín y col., 1994), y en CCs humanas (Drucker-Colín y col., 1999). Con base en estos conocimientos, se indujo la diferenciación de CCs de ratas con CM-EBF y posteriormente, se implantaron en ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal, observándose una disminución en la asimetría motora inducida por la lesión (Drucker-Colín y col., 1994).

Por otro lado, la eficacia de las CCs diferenciadas con CM-EBF se ha probado recientemente en una paciente con EP (Drucker-Colín y col., 1999). En este estudio, el tejido suprarrenal se obtuvo de un donador cadavérico de 14 años, las CCs se cultivaron y estimularon durante 10 días con CM-EBF. Posteriormente, las células diferenciadas se resuspendieron e implantaron utilizando cirugía estereotáxica en la cabeza del núcleo

caudado de la paciente. Posterior al trasplante, se observaron cambios motores significativos sobre todo en el temblor y la rigidez, así como una reducción en una tercera parte de la administración de L-DOPA. También se realizó el seguimiento con tomografía por emisión de positrones [PET-Scan] antes y 7 meses después del trasplante. Este estudio reveló un incremento en los receptores tipo D₂ a dopamina y en el metabolismo de la glucosa después del trasplante. En conclusión, este estudio preliminar sugiere que las CCs diferenciadas con CM-EBF, pueden ser utilizadas como material de trasplante en pacientes con EP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Observaciones preliminares de nuestro laboratorio, nos permitieron determinar que la EMT [0.7 mTeslas, 60 Hz] es capaz de inducir la neurogenización *in vivo* de CCs trasplantadas intracerebralmente en ratas con lesión unilateral de la SNc por efecto de la microinyección estereotáxica de 6-OHDA (Datos no publicados). Luego de dos meses, la EMT indujo un fenotipo neuronal en un 30% de las CCs trasplantadas, así como una mayor viabilidad en comparación con el grupo que no fue estimulado.

Además, uno de los hallazgos más importantes de este experimento fue la observación de células positivas a tirosina hidroxilasa [TH⁺] en la ZSV de ambos ventrículos laterales. Hasta este momento, no se había reportado la presencia de estas células en ratas control. La posible migración de las CCs trasplantadas hacia la ZSV, se descartó marcándolas antes de ser trasplantadas con Fluoro-Gold. Por lo cual, decidimos determinar el efecto de la lesión de la SNc, el trasplante de CCs y/o la EMT en la neurogénesis de la ZSV.

HIPÓTESIS

Las células progenitoras neuronales presentes en la zona subventricular se diferencian en neuronas dopaminérgicas *in situ* en respuesta a la lesión de la sustancia nigra, trasplante de células cromafines en el estriado y estimulación magnética transcraneal.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto de la EMT sobre las células cromafines trasplantadas.
2. Establecer el efecto del trasplante de CCs sobre la conducta de giro que presentan los animales con lesión unilateral de la SNc.
3. Determinar el efecto de la EMT sobre la conducta de giro que presentan los animales con lesión unilateral de la SNc.
4. Estudiar el efecto combinado del trasplante de CCs y la EMT sobre la conducta de giro que presentan los animales con lesión unilateral de la SNc.
5. Determinar que tratamiento [lesión de la SNc, trasplante de CCs o EMT] induce la expresión de células TH⁺ en la ZSV.
6. Establecer si los precursores endógenos que proliferan en la ZSV dan origen a las células TH⁺ que se observan en esta zona.
7. Determinar si las células TH⁺ que se observan en la ZSV son neuronas dopaminérgicas funcionales: expresan marcadores, liberan dopamina, presentan potenciales de acción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 186 ratas macho de la cepa Wistar (180-200 g) para este estudio. Los animales se mantuvieron en grupos de seis con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (luz de 7:00 a 19:00 hrs.), con una temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se proporcionó comida y agua *ad libitum*. Estos animales se dividieron de acuerdo a los grupos experimentales que se describirán más adelante.

Todos los animales se trataron de acuerdo con procedimientos aprobados por la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999). Se realizaron todos los esfuerzos para prevenir el sufrimiento y reducir al máximo el número de los animales utilizados.

LESIÓN DE LA SUSTANCIA NIGRA CON 6-OHDA

Previa anestesia con ketamina-xylazina (87 y 13 mg/kg, respectivamente) y bajo condiciones asépticas los animales se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se lesionó unilateralmente la SNc mediante la inyección intracerebral de 4 μl de 6-Hidroxidopamina (6-OHDA, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ + 0.5% de ácido ascórbico en 0.9% de NaCl) según la técnica descrita previamente (Dunnett y col., 1981). Las coordenadas estereotáxicas fueron: antero-posterior (AP): -4.8 mm, medio-lateral (ML): -1.6 mm, dorso-ventral (DV): -8.2 mm. La barra de incisivos se colocó ~2.4 mm debajo de la línea interaural (Paxinos y Watson, 1986).

PRUEBAS CONDUCTUALES

Para determinar el éxito de la lesión de la SNc y para llevar a cabo la monitorización de los efectos funcionales inducidos por el trasplante de CCs y la EMT, se evaluó la actividad rotatoria inducida por anfetamina (4 mg/kg de peso, IP). Para determinar esta conducta, los animales se colocaron en un rotómetro electrónico y 10 minutos después de recibir la anfetamina se cuantificó la conducta de giro [vueltas completas de 360°] durante 90 min. Se seleccionaron para el experimento sólo los animales que mostraron más de 500 giros hacia el costado ipsilateral a la lesión en el tiempo predeterminado (Björklund y Stenevi, 1979; Dunnett y col., 1981).

Las ratas lesionadas se seleccionaron y dividieron en 4 grupos (n=8): Grupo 1 (Lesionado + EMT-falsa), Grupo 2 (Lesionado + EMT), Grupo 3 (Lesionado + trasplante de CCs + EMT-falsa), Grupo 4 (Lesionado + trasplante de CCs + EMT). Se realizaron evaluaciones conductuales cada 15 días en un tiempo de 2 meses después del trasplante y/o inicio de la EMT.

OBTENCIÓN Y TRASPLANTE INTRACEREBRAL DE CCs

Ratas recién nacidas de 3 a 5 días (~500 neonatos) se sacrificaron mediante exposición a hielo. La médula suprarrenal se obtuvo mediante laparotomía y se colocó en solución salina libre de calcio (Sigma) complementada con albúmina de suero bovino (1 mg/ml, BSA; Sigma). Los fragmentos se disociaron enzimáticamente en solución salina libre de calcio complementada con 2 mg/ml de colagenasa tipo I (Worthington) y 1.5 mg/ml de

desoxirribunocleasa tipo II (Sigma) durante 45 minutos a una temperatura de 37° C. Posteriormente las células se dispersaron mecánicamente y la suspensión celular se centrifugó a 800 rpm, a una temperatura de 20°C durante 10 minutos. Las CCs ya disociadas se suspendieron en medio de cultivo (Dulbecco's modified eagle: DMEM; GIBCO), el cual se complementó con 4.5 µg de insulina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 mg/ml de estreptomycin (sigma) y 2.5 mg/ml de fungizone (Gibco) y mantuvieron en una incubadora hasta que se requirieron para el trasplante. La viabilidad celular se determinó utilizando la tinción de azul de Tripano como método de exclusión.

Los animales receptores se anestesiaron con ketamina-xylazina (87 y 13 mg/kg, respectivamente), y se colocaron en el aparato de cirugía estereotáxica (Kopf Instruments, Tujunca, CA). Una vez localizadas las coordenadas sobre la superficie del cráneo se utilizó un minitaladro para realizar un trepano en el hueso parietal. Las CCs se aspiraron utilizando una microcánula (<100 µm), la cual se acopló a una jeringa Hamilton de 25 µl montada en un microinyector (KD Scientific). Las coordenadas estereotáxicas para el trasplante fueron: AP: 0 mm; ML: -3 mm; DV: -5 mm. La barra de incisivos se colocó ~2.4 mm debajo de la línea interaural (Paxinos y Watson, 1986). El medio de cultivo (DMEM, 4 µl) contiene una suspensión de 1×10^6 CCs las cuales fueron inyectadas a una proporción de flujo de 1 µl/min en la cabeza del núcleo caudado en el lado lesionado del cerebro. Este procedimiento permitió depositar la cantidad exacta de CCs en el cerebro del receptor.

ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL [EMT]

Los animales se colocaron en cámaras de plástico diseñadas para mantenerlos inmóviles mientras reciben la EMT. El estímulo consistió en un campo magnético oscilatorio (60 Hz; 0.7 mTeslas) aplicado diariamente 2 horas en la mañana y 2 horas por la tarde. Los animales no mostraron ninguna señal de incomodidad mientras fueron expuestos a la EMT. El tiempo de exposición diaria a EMT se seleccionó en base a resultados previos que demostraron la neurogenización de las CCs *in vitro* (Drucker-Colín et al., 1994). El tiempo de exposición *in vivo* se determinó en base a experimentos preliminares los cuales indicaron 60 días de EMT como óptimo (Verdugo-Díaz y Drucker-Colín). En los experimentos en los cuales los animales fueron inyectados con BrdU, las ratas fueron expuestas sólo durante una semana a EMT. Un par de bobinas Helmholtz (7 cm de diámetro) generó los campos magnéticos (se seleccionó este tipo de bobinas para minimizar los efectos del campo eléctrico). La exposición de dos horas a EMT generó un incremento máximo de 0.5°C de temperatura dentro de la cámara. Las bobinas se colocaron una dorsal y otra ventral a la cabeza de la rata, a una distancia de 12 centímetros una respecto a la otra, teniendo como punto medio la cabeza del animal. La EMT se empezó a realizar un día después del trasplante. Los animales que no fueron expuestos a EMT no se separaron de los animales estimulados, ellos se colocaron en las mismas cámaras de plástico a una distancia de 1.5 m del grupo que recibía la EMT.

INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA A TH

Al finalizar las pruebas conductuales (60 días, precedido por 30 días de observación después de la lesión con 6-OHDA), los 32 animales (8 por cada grupo experimental) recibieron una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg, IP), y posteriormente fueron perfundidos con solución salina seguida de paraformaldehído frío (4%). Los cerebros se retiraron y colocaron durante 24 hrs en paraformaldehído al 4%, posteriormente se resuspendieron en sacarosa al 20% durante 24 hrs. Finalmente, los cerebros se seccionaron en cortes coronales (30 μ m). Las cortes recibieron un pre-tratamiento de bloqueo con suero de caballo, y se incubaron toda la noche a 4°C en buffer de fosfatos (PBS) al cual se le adicionó el anticuerpo primario anti-Tirosina Hidroxilasa (Chemicon; dilución 1:2000). Posteriormente, los cortes se lavaron con PBS e incubaron en presencia del anticuerpo secundario anti-conejo biotilado (Vector labs, dilución 1:1000) durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Subsecuentemente, los cortes se lavaron con PBS e incubaron en presencia del complejo avidina-biotina-peroxidasa. El revelado de la inmunohistoquímica se realizó con diaminobenzidina (DAB) (Hsu et al. 1981); posteriormente los cortes se montaron en portaobjetos y observaron en el microscopio óptico. Para la inmunofluorescencia a TH, los cortes se incubaron durante 24 hrs en presencia del anticuerpo primario anti-conejo dirigido a la enzima tirosina hidroxilasa (Chemicon, 1:200). Posteriormente los cortes se lavaron con PBS e incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente en presencia de Tetrametil Rodamina Isoniacida (TRITC), la cual se conjugó con IgG anti-conejo (Vector Labs. Inc., dilución 1:500).

Los cerebros de los animales control (ratas no lesionadas) se analizaron también mediante inmunohistoquímica a TH. Cuarenta animales adicionales se dividieron en los siguientes grupos: Control (n = 8), control + EMT-falsa (n = 8), control + EMT (n = 8), control + trasplante de CCs (n = 8), y control + trasplante de CCs + EMT (n = 8). Los datos de estos animales aparecen en la Tabla I y se refieren solamente a los primeros cinco grupos mencionados como controles.

MARCAJE DE CÉLULAS CROMAFINES CON FLUORO-GOLD

Para determinar si hay o no migración de las CCs trasplantadas, éstas fueron obtenidas como previamente se describió y cultivadas según técnica descrita (Drucker-Colín *et al.*, 1994) en presencia de 1% de Fluoro-Gold (FG, Molecular Probes H-7599) durante dos días. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con DMEM, recolectaron mecánicamente, y trasplantaron en la cabeza del núcleo caudado de 8 animales lesionados agrupados de la siguiente forma: Grupo FG_A: Lesión + Trasplante de CCs marcadas con FG + EMT-falsa (n = 4); Grupo FG_B: Lesión + Trasplante de CCs marcadas con FG + EMT (n = 4). Dos meses después de realizado el trasplante de CCs marcadas con FG, todos los animales se sacrificaron previa sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg/1 I.P), para ser perfundidos con solución salina seguida de paraformaldehído frío (4%). Los cerebros se retiraron y colocaron durante 24 hrs en paraformaldehído (4%), posteriormente se suspendieron en sacarosa al 15 % durante 24 hrs. Una vez concluido este proceso los cerebros se cortaron en rebanadas de 30 µm y procesaron para inmunofluorescencia a TH.

TRANSFECCIÓN DE CCs UTILIZANDO UN VECTOR ADENOVIRAL (AdGFP)

Se han descrito métodos para la construcción de vectores adenovirales con defecto de replicación (He, 1998). Estos vectores adenovirales son E1-a, parcialmente E1-b, y E3-delete, todos ellos basados en el adenovirus humano tipo 5. Se usó un plasmido que transporta el gen reportero que expresa la Proteína Fluorescente Verde (GFP) bajo control transcripcional pCMV (pAd-Track), para la construcción del vector AdGFP. La transfección de las células cromafines con el AdGFP se realizó *in vitro* en cajas Petri (1 X 10⁷ células en 25 cm²). Veinticuatro horas después de cultivadas, las células se incubaron a 37°C durante dos horas con medio de cultivo libre de suero (OptiMEM), y se agregó el AdGFP a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 en 50 µl de OptiMEM. Después de dos horas, las CCs se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm, esto permitió retirar el medio rico en adenovirus y recolectar las células. Posteriormente, las CCs se resuspendieron en 1 ml de DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino lo cual permitió inactivar al AdGFP aun presente. La viabilidad celular se evaluó con azul de tripano. Después de la transfección, se lavaron dos veces las células con DMEM, se colectaron mecánicamente y trasplantaron en el cerebro de 16 ratas con lesión de la SN, las cuales se dividieron de la siguiente forma: Grupo GFP_A: Lesión + trasplante de CCs GFP⁺ + EMT-falsa (n=8); Grupo GFP_B: Lesión + trasplante de CCs GFP⁺ + EMT (n=8). Catorce días después, los animales se sacrificaron previa sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg IP), para ser perfundidos con solución salina seguida de paraformaldehído frío (4%). Los cerebros se removieron y colocaron en paraformaldehído durante 24 hrs y posteriormente

en sacarosa al 20% otras 24 hrs; finalmente se cortaron en rebanadas de 30 μm y estas fueron procesadas para inmunofluorescencia a tiroxina hidroxilasa.

ADMINISTRACIÓN IN VIVO DE 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA

Para determinar si células progenitoras de la ZSV proliferan después de los diferentes tratamientos, un anticuerpo dirigido contra el análogo de timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina [BrdU] se utilizó para identificarlas. Un grupo de 32 ratas lesionadas se dividió en 4 grupos (n=8): Grupo BrdU_A, (Lesionado + EMT-falsa), Grupo BrdU_B, (Lesionado + EMT), Grupo BrdU_C, (Lesionado + trasplante de CCs + EMT-falsa), Grupo BrdU_D (Lesionado + trasplante de CCs + EMT. Una semana después de la última evaluación conductual los animales lesionados se agruparon en los diferentes grupos, los grupos BrdU_C y BrdU_D fueron trasplantados y los grupos BrdU_B y BrdU_D recibieron EMT. 45 días después de haber iniciado los tratamientos, todos los animales se inyectaron dos veces al día durante 2 días con BrdU (50 mg/kg IP, disuelto en 0.9% NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). 2 semanas después de la última inyección, todos los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital (100 mg kg/1 IP) al tiempo que fueron perfundidos con solución salina seguida de paraformaldehído al 4%. Posteriormente los cerebros fueron removidos y procesados para inmunofluorescencia a BrdU, TH, NeuN y GFAP como se explica más adelante.

INMUNOFLUORESCENCIA PARA BrdU, TH, NeuN Y GFAP

Una vez removidos los cerebros, estos fueron post-fijados en paraformaldehído al 4% durante 24 hrs, posteriormente se lavaron con agua desionizada. Una vez lavados se obtuvo el segmento correspondiente al estriado y los ventrículos laterales mediante una matriz metálica, y este segmento se incluyó en parafina. Una vez parafinados, los segmentos se cortaron en secciones utilizando un microtomo en cortes coronales de 10 μm y se colocaron en portaobjetos para ser desparafinados. A continuación, los cortes se colocaron en una solución 1 N de ácido clorhídrico durante 30 min a 37°C; luego de este procedimiento, se lavaron con PBS e hidrataron con una combinación de alcohol + glicina, e inmediatamente después se incubaron con una solución de bloqueo (suero de caballo al 1.5%) durante 30 min. a 4°C. Al finalizar este paso, los cortes se lavaron con PBS e incubaron durante 36 hrs a 4°C en PBS (Kit II anti-BrdU, Roche Molecular Biochemicals) al cual se le adicionó el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Kit II anti-BrdU de ratón, Roche Molecular Biochemicals, dilución 1:50). Después de este tratamiento, los cortes se lavaron con PBS e incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con Isotiocianato Fluoresceínado (FITC) el cual se conjugó con el anticuerpo secundario anti-ratón (Kit II anti-BrdU, Roche Molecular Biochemicals). Se consideraron células positivas a BrdU aquellas en las cuales se observó el núcleo redondo u oval fluorescente. Para determinar si las células marcadas con BrdU observadas en la ZSV se diferenciaron después de los tratamientos se utilizaron otros anticuerpos específicos. Los cortes una vez procesados para BrdU, se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH de conejo; Chemicon Temecula, California, dilución 1:1000) o con el antígeno neuronal nuclear (anti-NeuN monoclonal de ratón; Chemicon Temecula, California, dilución 1:500).

Luego de este procedimiento los cortes se lavaron con PBS. El anticuerpo secundario utilizado para visualizar TH o NeuN fue TRITC-conjugado anti-conejo o anti-raton respectivamente (Zymed, dilución 1:250). La incubación de los anticuerpos secundarios se realizó con solución de bloqueo (BSA 1%) durante 2 hrs a temperatura ambiente. Los cortes para el control negativo se trataron igual, sólo que se omitieron los anticuerpos primarios. Una vez concluída la técnica de inmunofluorescencia los cortes se cubrieron con solución de montaje especial para fluorescencia (DAKO).

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Un microscopio Nikon Diaphot equipado para ver fluorescencia se utilizó para obtener las fotografías. Para poder observar las CCs marcadas con Fluoro-Gold, se utilizó un juego de filtros de excitación entre 340 y 510 nm de emisión. Para la inmunofluorescencia a TH, se colocaron filtros Nikon para Rodamina (510-560 nm de excitación y 590 nm de emisión). Los cortes se examinaron con objetivos de inmersión en aceite (10 X, 0.45 NA, Leitz Wetzlar, Alemania, y 60 X, 1.4 NA, Plan Apo, Nikon, Japón), primero mediante microscopía de contraste de fases y después con fluorescencia utilizando los filtros respectivos para visualizar FG o TH. Las imágenes digitales se obtuvieron alternativamente cambiando el CCD de la cámara digital (SenSys 0401E, Photometrics/Roper Scientific,; Tucson, AZ, EE.UU.). La iluminación se limitó por una contraventana electrónica (Lambda 10, Sutter Instruments). Las exposiciones utilizadas se encontraban entre 0.6 y 1.0 s. Las imágenes se guardaron en formato TIFF (entre 8 y 16 bits de resolución) y procesadas con Metamorph 4.0 (Universal Imaging Corp. West Chester PA, EE.UU).

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las fotografías de los cortes cerebrales se obtuvieron mediante la utilización de microscopia confocal, la cual utiliza un laser de Ar Kr/Ar (Bio-Rad MCR 1024), el cual examina el sistema a través de un microscopio invertido (Nikon TMD 300). Las fotografías se tomaron con objetivos de aceite de inmersión (10 X, 0.45 NA, Leitz-Wetzlar, Alemania y 60 X, 1.4 NA, Plan Apo, Nikon, Japón). Para obtener las imágenes de GFP y FITC-inmunofluorescente (BrdU), las muestras se excitaron con 488 nm y una emisión de luz con un filtro de 522/DF32 nm. Para las imágenes de TRITC-inmunofluorescente (TH y NeuN) las muestras se excitaron con 568 nm y una emisión de luz con un filtro de 605/DF32 nm. Las imágenes de 488 y 568 nm de excitación se obtuvieron utilizando dos canales fotomultiplicadores, en algunas ocasiones de forma separada. El procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas se realizó fuera de la línea con un software escrito por Todd Clark Breile (Confocal Assistant 4.02). La composición final de la imagen se realizó con Paint Shop Pro 5.0 (Jasc Software Inc) y Microsoft PowerPoint.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El número de células inmunoreactivas a TH se determinó con un analizador digital de imágenes que utiliza el programa analySYS 2.1 (Carl Zeiss Company). Los cortes se examinaron utilizando un microscopio de luz mediante un objetivo 40X, una videocámara SONY se acopló al analizador para obtener una última amplificación a 100X.

LIBERACIÓN DE DOPAMINA

Para este estudio, se integraron 5 grupos experimentales. Las ratas con lesión de la SNc se seleccionaron y dividieron en 3 grupos (n=8): Grupo 1 (Lesión); Grupo 2 (Lesión + EMT); Grupo 3 (Lesión + Trasplante de CCs); Grupo 4 (Lesión + Trasplante de CCs + EMT). Adicionalmente, un grupo de ratas no tratadas se mantuvo en paralelo (Control, n=8). Dos meses después del trasplante de CCs o del seguimiento análogo, todos los animales recibieron una sobredosis de hidrato de cloral al 10%. Posteriormente fueron decapitados y sus cerebros removidos rápidamente y mantenidos a - 4°C en líquido cerebroespinal artificial [LCEa] perfusado con una mezcla de O₂/CO₂ [95%, 5% respectivamente]. El LCEa contiene (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 Na₂HPO₄, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 glucosa. Se ajustó el pH a 7.3 con NaOH, obteniéndose una solución de 300 mOsm/L.

En este medio, los cerebros se colocaron en una matriz para obtener el fragmento correspondiente al neocórtex. Bajo las mismas condiciones para mantener el tejido vivo, el fragmento se colocó en un vibratomo 3000 (Vibratome company, Saint Louis, MO USA) donde se obtuvieron cortes coronales de 300 µm [un promedio de 6 por animal] de acuerdo

a la metodología previamente reportada por Wang y col., en el 2003. Las rebanadas se colocaron en LCEa oxigenado y a temperatura ambiente. Una hora después se disecó la ZSV y el estriado (ambos zonas ipsilaterales a la lesión de la SN y del trasplante) utilizando un dispositivo especial para obtener fragmentos de 5 mm de longitud y 3 mm de ancho [FIGURA 9 A].

Los fragmentos de la ZSV y del estriado se transfirieron a recipientes de acrílico con un fondo en red el cual se coloca dentro de un tubo Eppendorf de 1 ml y se acopla a un tubo para suministrar oxígeno. Este dispositivo se diseñó para facilitar la manipulación y exposición de los fragmentos de tejido a las diferentes soluciones del experimento. Por periodos de 10 min se detectó la liberación de dopamina en las diferentes condiciones experimentales, de acuerdo a lo descrito previamente por Galárraga y col., en 1999. Los fragmentos de tejido correspondientes a la SZV y al estriado [FIGURA 9 B,C] se colocaron en recipientes separados, uno para cada región. A continuación, se sometieron a las cuatro condiciones experimentales.

Los tubos Eppendorf se prepararon de la siguiente forma: Tubo 1, *condición control*: 200 µl de LCEa normal. Tubo 2: *condición despolarizante*: 200 µl de LCEa con 20 mM de KCl adicional (intercambiado por 20 mM de NaCl para mantener osmolaridad). Tubo 3: *condición deficiente de calcio*: 200 µl de LCEa sin CaCl₂ mas 20 mM de KCl adicional. Tubo 4: *condición control*: 200 µl de LCEa normal. Todas las soluciones se mantuvieron oxigenadas, se ajusto su pH a 7.3 y se conservaron a 300 mOsm/L (Galarraga y col., 1999).

Después de la exposición secuencial de los fragmentos de la ZSV y del estriado, se tomaron 20 µl de LCEa de los tubos 1 al 4 para ser analizados en un equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Lo anterior, con el objetivo de detectar la concentración de dopamina por volumen. La fase móvil se preparó con 1 litro de agua desionizada y filtrada a la cual se le adicionó 12.9 g el ácido cítrico (0.05 M), 4.1 g de acetato de sodio (0.05M) y 186 mg de EDTA (0.05 mM). El pH se ajustó a 5.2 con 1 M de HClO₄. Los 20 µl de cada muestra se colocaron en el equipo utilizando un autoinyector [Rheodyne 712S] para su análisis. La detección electroquímica se realizó utilizando un detector BAS 4C (EDC) con un electrodo de carbono Ag/AgCl a un voltaje 650 mV. Las muestras se analizaron con una tasa de flujo de 1 mL/min a través de una columna Spherisorb 150 mmx4.6 mm, ODS-15 µm. Utilizando este procedimiento se detectó una espiga, la cual se comparó con un standard externo de dopamina (625 fmol de 3,4-Hidroxytyramine; Dopamine, Sigma). El standard se corrió antes del análisis de la muestra, esto permitió asociar las espigas. Para determinar la concentración de dopamina se utilizó el software Unipoint (Gilson, Inc), el cual permitió calcular automáticamente el área bajo la espiga detectada por el equipo de HPLC.

ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

Para este estudio, se integraron 2 grupos experimentales. Por periodos, se seleccionaron ratas con lesión de la SNc (n=30) y se trasplantaron con CCs las cuales se integraron en el grupo 1 (Lesión + Trasplante de CCs). Adicionalmente, un grupo de ratas no tratadas se mantuvo en paralelo (Control, n=20). Dos meses después del trasplante de CCs, los animales recibieron una sobredosis de hidrato de cloral al 10%. Posteriormente, fueron

decapitados y sus cerebros removidos rápidamente y mantenidos a -4°C en LCEa perfundido con una mezcla de O_2/CO_2 [95%, 5% respectivamente]. El LCEa contenía (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO_3 , 1.25 Na_2HPO_4 , 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 25 glucosa. El pH se ajustó a 7.3 con NaOH, obteniéndose una solución de 300 mOsm/L.

Del cerebro se obtuvo un bloque de tejido que se montó en la platina de un vibratomo (mod. 3000, Vibratome Company, Saint Louis, MO USA) donde se realizaron cortes coronales de 350 μm de espesor conteniendo el neocórtex y la zona subventricular (ZSV). De los cerebros de varios animales se obtuvieron rebanadas sagitales conteniendo la sustancia nigra compacta (SNc) para registrar las neuronas dopaminérgicas contenidas en esta zona. Una vez obtenidas, las rebanadas se mantuvieron en LCRA oxigenado a temperatura ambiente [$\sim 24^{\circ}\text{C}$], por al menos una hora antes de iniciar la sesión de registros electrofisiológicos.

Posteriormente, una rebanada de tejido cerebral fue transferida a una cámara de registro (plexiglass) y perfundida con LCRA a una tasa de 3-4 ml/min a 35°C utilizando un sistema de perfusión por gravedad. Las células de la ZSV se identificaron utilizando un sistema de microscopía y video en infrarrojo (Eclipse 600NF, Nikon, Japan) equipado con un objetivo de inmersión en agua 40X (Nikon, Japan) y una cámara CCD (CCD100S, DAGE.MTI, Michigan city, IN, USA).

Registro de célula completa (Whole Cell): Para el registro de las células neuronales se utilizó la técnica de célula completa (whole cell) en el modo de current clamp o voltaje-

clamp utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments). La señal fué filtrada a 5Hz y digitalizada utilizando una interfase Digidata 1322A, (Axon Instruments). Asimismo, la señal fué monitoreada y almacenada para su posterior análisis mediante una computadora personal equipada con el programa pClamp8 (Axon Instruments, Union City, CA).

Las células registradas en la ZSV se localizaron debajo de las células endimales de la pared lateral izquierda del ventrículo lateral a no más de 100 μm del borde. Las células dopaminérgicas se registraron en la SNc.

Los microelectrodos de registro se elaboraron con capilares de borosilicato (Frederick Haer & Co, Bowdoinham ME) mediante un estirador de micropipetas horizontal (Sutter Instruments CO. P-87) obteniendo una resistencia de 4 a 7 $\text{M}\Omega$. Los microelectrodos de registro fueron llenados con solución interna la cual consistió (en mM): 119 KMeSO_4 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0.7 Na_2GTP , biocitina al 0.5%. La solución se ajustó a un pH de 7.3 con KOH, y a 280-300 mOsm/L.

En las células de la ZSV que presentaron potenciales de acción se obtuvieron curvas intensidad-frecuencia (I-F) a partir de las respuestas de voltaje de la célula registrada en fijación de corriente mediante pulsos de corriente despolarizante (2 seg. de duración) que incrementaban gradualmente (15mV en cada pulso) hasta alcanzar la frecuencia máxima de disparo, partiendo de un potencial de membrana de $\approx -70\text{mV}$. Las curvas intensidad-voltaje (I-V) obtenidas de las células de la ZSV se construyeron a partir de las respuestas de las

células a la aplicación de pulsos de corriente o comandos de voltaje hiperpolarizantes y despolarizantes. Estas curvas I-V se compararon con las obtenidas de las células dopaminérgicas registradas en la SNc y se utilizaron los mismos protocolos electrofisiológicos. La presencia de corrientes postsinápticas espontáneas (CPSe) se examinó en fijación de voltaje a un potencial de mantenimiento de -70 mV. Las CPSe se registraron en condiciones control y después de aplicar 4-aminopiridina (4-AP).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA y Kruskal Wallis o Friedman (para muestras no pareadas o pareadas, respectivamente) para comparar las medias de la liberación de dopamina (fmol/20 μ l) entre los grupos y una prueba post hoc de Tukey o Student-Newman-Keuls para las comparaciones pareadas. Se fijó a una $p < 0.05$ como valor significativo.

RESULTADOS

Lesión selectiva de las neuronas DA de la SNc por la inyección de 6-OHDA.

Para inducir la lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas [DA] de la SNc, se inyectó unilateralmente mediante cirugía estereotáxica $8\mu\text{g}/4\mu\text{l}$ de 6-OHDA, según la técnica descrita por Dunnett y col., (1981). En un experimento adicional, se decidió determinar la lesión de la SNc y el grado de denervación dopaminérgica del estriado ipsilateral a la lesión mediante inmunofluorescencia a TH [FIGURA 1].

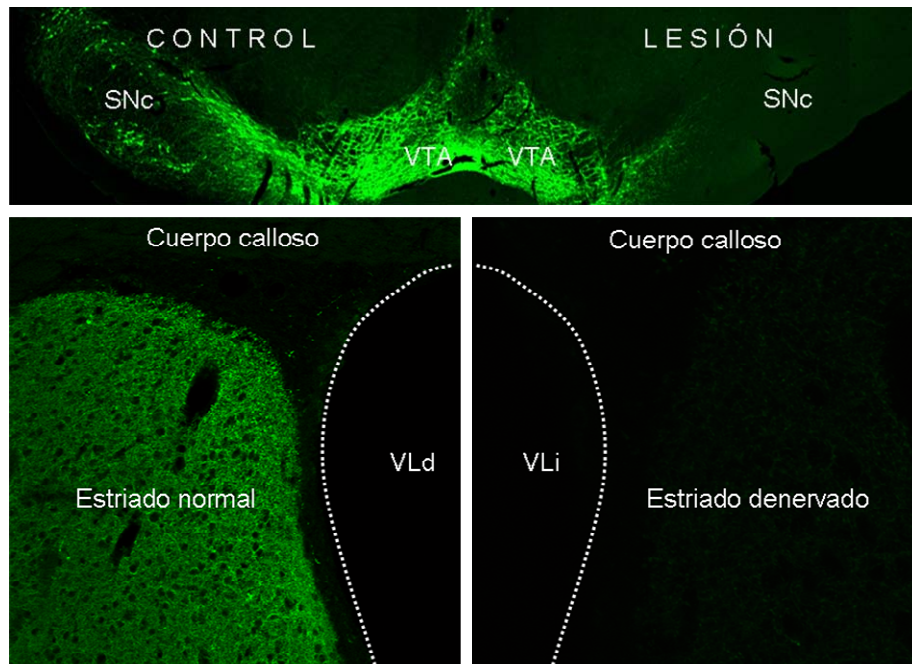


FIGURA 1 | **Lesión selectiva de la SNc por la inyección estereotáxica de 6-OHDA.** La magnitud y especificidad de la lesión con 6-OHDA se puede observar por la pérdida casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la denervación del estriado ipsilateral, comparado con el lado no lesionado

Recuperación funcional de la asimetría motora en ratas con lesión de la SNc.

Los animales lesionados con 6-OHDA se seleccionaron mediante la cuantificación de la conducta rotatoria en respuesta a la administración de D-anfetamina (Ungeistedt y Arbuthnott, 1970). Una vez integrados los grupos experimentales, se iniciaron una semana después los diferentes tratamientos [EMT y/o trasplante de CCs], posteriormente se evaluó la conducta rotatoria a las semanas 2, 4, 6 y 8, para determinar el grado de recuperación.

Como se muestra en la **FIGURA 2**, los animales con lesión de la sustancia nigra [SNc] que no recibieron ningún tratamiento [LESIÓN], mostraron un incremento gradual en el número de giros inducido por la inyección de D-anfetamina. Dos meses después, se demostró un incremento del 24.4% [$p = 0.008$] en la conducta rotatoria con respecto a la determinada al momento de la selección. Se encontró un resultado interesante en el grupo de animales con lesión de la SNc que fueron tratados con EMT [LESIÓN + EMT]. En este grupo se demostró que el incremento en el número de giros observado en el grupo LESIÓN, se previno por completo por efecto de la EMT. Dos meses después, los animales presentaron una reducción del 0.7% en la asimetría motora en relación con el resultado obtenido al momento de ser seleccionados. Al comparar este efecto con el resultados del grupo LESIÓN, se observó una recuperación del 25.1% en la conducta rotatoria inducida por la administración de D-anfetamina [$p < 0.001$].

El grupo de animales con lesión de la SNc que recibieron trasplante de CCs [LESIÓN + TRASPLANTE] presentaron una recuperación significativa en la asimetría motora, 38.4% menos que la registrada al momento del pre-trasplante [$p < 0.001$]. Dos meses después del

implante, este grupo de animales mostró una reducción del 62.8% en la conducta de giro [p <0.001] al compararse con el grupo que no recibió ningún tratamiento. Por otro lado, se observó una mejoría adicional del 9.3% en la conducta rotatoria [p =0.76] de los animales que fueron trasplantados con CCs y expuestos a EMT [LESIÓN + TRASPLANTE + EMT], esto en comparación con los animales que solo recibieron el trasplante de CCs.

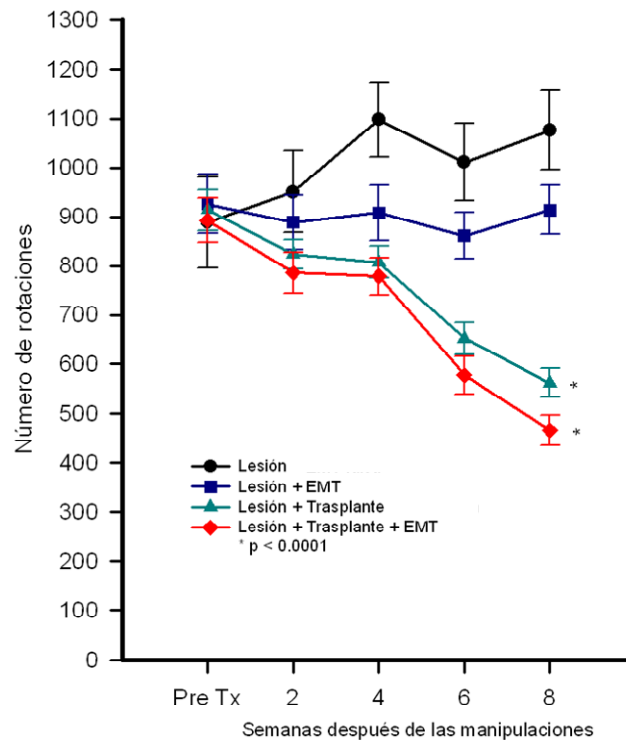


FIGURA 1 | **Recuperación de la conducta rotatoria en respuesta a la EMT y/o trasplante de CCs.** La gráfica muestra los cambios en el número de giros [aumento o disminución] inducido por la administración de D-anfetamina en todos los grupos experimentales antes y después de los diferentes tratamientos. n=8 en todos los grupos experimentales. Pre Tx: Pre-Tratamiento.

Análisis de los cerebros por inmunofluorescencia a tirosina hidroxilasa

Dos meses después de iniciados los diferentes tratamientos y concluidos los estudios funcionales, los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos para su análisis por inmunofluorescencia a TH. El examen macroscópico de los cerebros, permitió observar el orificio de entrada de la cánula sobre la corteza parietal izquierda de los animales que fueron trasplantados. No se observaron procesos infecciosos o lesiones secundarias a la cirugía estereotáxica.

En los 2 grupos experimentales que fueron trasplantados, la inmunoreactividad a TH permitió analizar la zona del implante. En el grupo [LESIÓN + TRASPLANTE], se observaron aglomerados de CCs [FIGURA 3 A, asteriscos] a lo largo del tracto de la cánula. No se observaron CCs más allá de 300 μm . Algunas células dispersas se localizaron cerca de la zona de trasplante, encontrándose en ellas un citoplasma claro y un núcleo grande [FIGURA 3 A]. Algunas de las células implantadas desarrollaron procesos neuríticos cortos [flechas]. Las CCs se localizaron principalmente en el núcleo caudado izquierdo, además en la cápsula interna, el globo pálido y en el núcleo accumbens. El número total de CCs fue de 565 ± 123 [n=8]. Algunas CCs se encontraron a lo largo del tracto de la cánula, desde la corteza hasta el cuerpo calloso, estas células no fueron cuantificadas.

En el grupo [LESIÓN + TRASPLANTE + EMT], se identificaron dos tipos de células [FIGURA 3 C]: CCs redondas con un diámetro de 12 a 15 μm [70%] y células dispersas con un soma alargado de 15-20 μm que desarrollaron procesos neuronales los cuales se

extienden en el estriado del huésped [30%]. El número total de CCs fue de 1076 ± 141 [n=8], es decir un 90% más que el grupo que no fue tratado con EMT [p=0.001]. Estas células se localizaron principalmente en el núcleo caudado izquierdo, la cápsula interna, el globo pálido y el núcleo accumbens. No se observaron CCs más allá de 300 μm del tracto de la cánula.

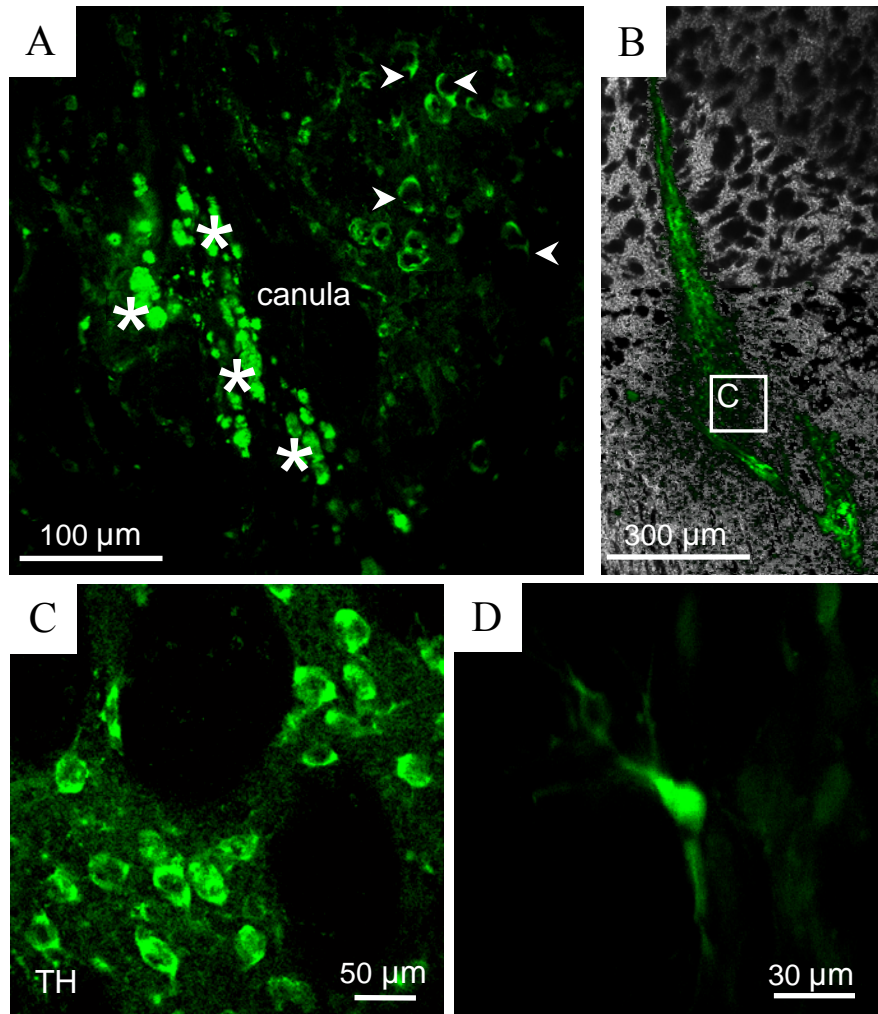


FIGURA 3 | Diferenciación de CCs trasplantadas por efecto de la EMT en ratas con lesión de la SNc. A: Fotografía obtenida por microscopía confocal del cerebro de una rata con lesión de la SNc y trasplante de CCs 60 días después del implante. Numerosas células inmunoreactivas a TH pueden observarse en esta zona, algunas células con procesos neuronales cortos [flechas]. B: Micrografía confocal de bajo aumento, la cual muestra la zona de trasplante 60 días después de la EMT. C: Micrografía de mayor aumento que muestra dos tipos de células TH⁺, CCs redondas y células con procesos neuronales. D. Micrografía de mayor aumento que muestra una célula CC inmunoreactiva a TH con morfología neuronal.

Por otro lado, al encontrar que la EMT previene el incremento de la conducta de giro inducida por la administración de D-anfetamina, se planteó la posibilidad de que la EMT podría estar restaurando de alguna manera la función dopaminérgica en el estriado denervado.

Nuestra primera aproximación, fue realizar inmunofluorescencia a TH en cortes coronales seriados de los cerebros de todos los grupos experimentales. Un resultado interesante fue que el grupo de animales con LESIÓN + TRASPLANTE + EMT, se encontraron células TH⁺ en la zona subventricular [ZSV] de ambos ventrículos laterales [FIGURA 4 A,B]. Con base en este hallazgo, se revisó específicamente la ZSV de los otros grupos. También se encontraron estas células en el grupo LESIÓN + TRASPLANTE y LESIÓN + EMT [FIGURA 4 C,D], incluso en los animales que sólo se lesionaron [FIGURA 4 E]. Sin embargo, no se encontraron células TH⁺ en la ZSV del grupo control [FIGURA 4 F]. La morfología de las células TH⁺ observadas en la ZSV sugiere un fenotipo neuronal [FIGURA 4].

Las CCs trasplantadas se identificaron claramente por su inmunoreactividad a TH, estas se localizaron principalmente dentro del núcleo caudado izquierdo, aunque algunas células se encontraron dispersas en núcleos cercanos [FIGURA 3 B]. No se observó inmunoreactividad cuando se omitió el anticuerpo primario para TH en todos los grupos experimentales [FIGURA 4 G].

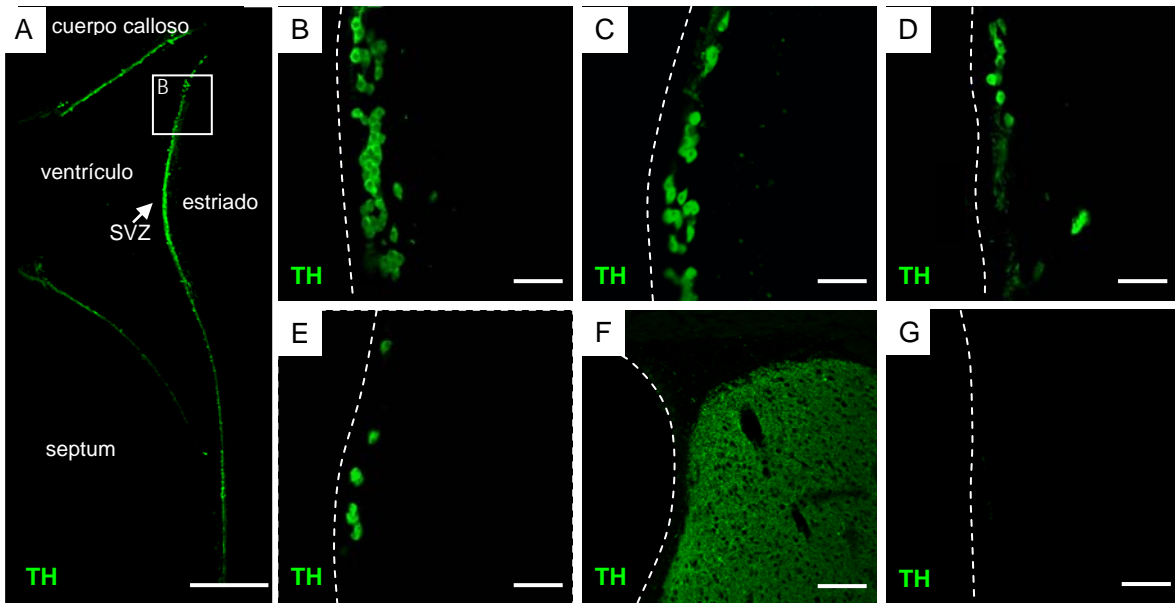


FIGURA 4 | Tratamientos que inducen la expresión de células TH⁺ en la zona subventricular. Micrográfias obtenidas por microscopia confocal en todos los grupos experimentales. A: Ventriculo lateral izquierdo de una rata con lesión de la SNc, trasplante de CCs y EMT. Numerosas células TH⁺ pueden observarse alineadas delimitando el ventriculo lateral. B: Micrografía de mayor aumento del área delimitada por el recuadro en A, se puede observar varias capas de células TH⁺ en la ZSV, algunas de ellas con morfología neuronal. C: Células TH⁺ en la ZSV de una rata con lesión de la SNc + trasplante de CCs. D: Micrografia confocal de la ZSV izquierda de una rata con lesión de la SNc + EMT, en ella se observan células TH⁺. E: Parte del ventriculo lateral de una rata con lesión de la SNc, se observan muy pocas células TH⁺. F: No se observan células TH⁺ en los animales control, solo se observa la inmunoreactividad de las terminales dopaminérgicas en el estriado. G: Micrografia del ventriculo lateral izquierdo de una rata con lesión de la SN, trasplante de CCs y EMT, en este caso se omitió el anticuerpo primario para TH. Escala: A = 400 μ m, B-F = 100 μ m.

En la **TABLA I** se muestra el número de células TH⁺ observado en la ZSV de todos los grupos experimentales. La lesión de la SNc estimuló la expresión de un número reducido de células TH⁺, este número se incrementó en los animales que además de la lesión de la SNc recibieron EMT. Las células TH⁺ están presentes en mayor número en los animales lesionados + trasplante, y lesionados + trasplante + EMT. En general hubo más células TH⁺ en la ZSV del ventriculo izquierdo [ipsilateral a la lesión] que en la ZSV

derecha [contralateral a la lesión], aunque no hay ninguna diferencia significativa entre ambos ventrículos. Además, se realizaron grupos control con el objetivo de determinar si el trasplante o la EMT inducían la expresión de las células TH⁺ en la ZSV. En estos grupos se encontró un menor número de células [TABLA I]. Dado que no hay diferencias significativas en el número de células TH⁺ localizadas en la ZSV de ambos ventrículos laterales y la distancia entre el sitio de trasplante y estos es considerable, se sugiere que las células TH⁺ observadas en la ZSV no tienen su origen a partir de las CCs trasplantadas.

TABLA I. NÚMERO DE CÉLULAS TH⁺ CUANTIFICADAS EN 500 μm DE EXTENSIÓN VERTICAL EN LA ZSV A NIVEL DEL ESTRIADO DE TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

GRUPOS EXPERIMENTALES	Ventrículo ipsilateral a la lesión/trasplante	Ventrículo contralateral a la lesión/trasplante
CONTROL	-	-
CONTROL + EMT-FALSA	-	-
CONTROL + EMT	85.0 ± 6.9	66.9 ± 4.9
CONTROL + TX	114.1 ± 8.7	117.3 ± 7.3
CONTROL + TX + EMT	185.2 ± 14.2	165.3 ± 8.0
LESIÓN + EMT	105.7 ± 7.5	112.4 ± 6.9
LESIÓN + EMT	142.7 ± 8.5	136.4 ± 9.1
LESIÓN + TX + EMT	241.3 ± 15.1 **	238.0 ± 12.6 **
LESIÓN + TX + EMT	289.3 ± 19.5 *	268.2 ± 17.0 *

EMT= Estimulación Magnética Transcranial; TX = trasplante.

* p < 0.01 diferencia estadística vs todos los grupos excepto vs el grupo Lesión + TX.

** p < 0.05 vs todos los grupos.

n = 8 en todos los grupos.

Trasplante de células cromafines marcadas con Fluoro-Gold y GFP

Para descartar la posible migración de las CCs hacia la ZSV, éstas fueron marcadas Fluoro-Gold [FG] antes de ser trasplantadas con. Dos meses después de su trasplante en la cabeza del núcleo caudado en ratas con lesión de la SNc y de la exposición o no a la EMT, se realizó inmunofluorescencia a TH. Posteriormente, con microscopia de fluorescencia se pudo identificar la presencia de las CCs marcadas con FG en el sitio de trasplante y en la periferia de éste [FIGURA 5 A]. La mayoría de las células trasplantadas fueron TH⁺ [FIGURA 5 B]. Sin embargo, no se observaron células marcadas con FG en la ZSV de ambos ventrículos laterales [FIGURA 5 B]. Con base en reportes, que indican que el marcaje con FG compromete la viabilidad celular (Garred *et al*, 1991), y por la probabilidad que el FG liberado marque otras células cerca del área de trasplante, se realizó un experimento adicional utilizando un procedimiento de marcaje diferente basado en la expresión de la proteína fluorescente verde [GFP]. Un mes después del trasplante, se realizó inmunofluorescencia a TH. La mayoría de las células marcadas con GFP en la zona de trasplante fueron positivas a TH [FIGURA 5 C, D]. No se encontraron células GFP cerca de los ventrículos laterales o en la ZSV [FIGURA 5 F], aunque se observaron células TH⁺ en la ZSV de ambos ventrículos laterales en los animales trasplantados y expuestos a EMT [FIGURA 5 E]. Estos resultados sustentaron la idea de que las células TH⁺ observadas en la ZSV no tienen su origen a partir de las CCs trasplantadas. Es probable que estas células tengan su origen a partir de células progenitoras neuronales [CPN] presentes en la ZSV, las cuales se diferenciaron *in situ* en células TH⁺ por efecto de los diferentes tratamientos.

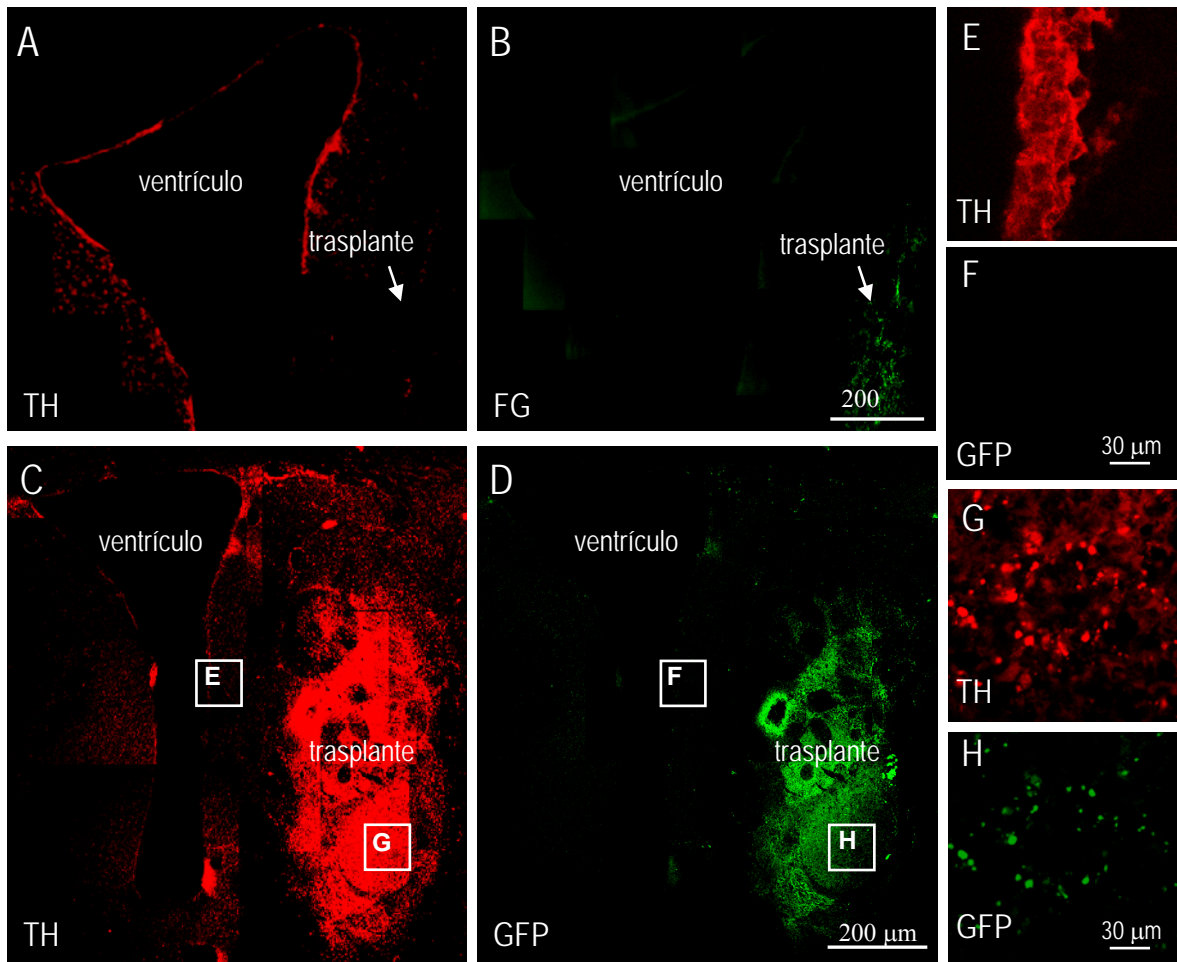


FIGURA 5 | Distribución de las células cromafines trasplantadas marcadas con FG y GFP.
 A,B: Micrografía compuesta de baja amplificación tomada por microscopía de fluorescencia de la misma sección coronal del cerebro de una rata con lesión de la SNc, dos meses después del trasplante de CCs marcadas con Fluoro-Gold [FG] y el tratamiento con EMT. A: Inmunoreactividad a TH. B: Fluorescencia a FG. Se localizaron células TH⁺ en la zona de trasplante y en la ZSV del ventrículo ipsilateral a la lesión, las células marcadas con FG solo se localizaron en el sitio de trasplante. C,D: Micrografía compuestas de baja amplificación tomada por microscopia confocal de la misma sección coronal del cerebro de una rata con lesión de la SNc, un mes después del trasplante de CCs [GFP⁺] y EMT. C: Inmunofluorescencia a TH. D: Fluorescencia a GFP. La mayoría de las CCs trasplantadas fueron positivas a TH y GFP. Esto se puede distinguir claramente en las micrografías de mayor aumento obtenidas en las áreas de trasplante marcadas por los recuadros correspondientes [G y H]. E: Inmunoreactividad a TH, F: Fluorescencia a GFP del mismo campo mostrado en E, en estas imágenes, puede verse que células TH⁺ localizadas en la ZSV no fueron GFP⁺.

Caracterización de las células TH⁺ de la ZSV

Teniendo como antecedente el hallazgo de las células TH⁺ en una de las áreas con mayor actividad neurogénica, como lo es la zona subventricular [ZSV], se decidió determinar si las células progenitoras neuronales [CPN] que proliferan en la ZSV, se diferencian *in situ* en células TH⁺ en respuesta a los diferentes tratamientos.

Para confirmar nuestra hipótesis, se integraron nuevamente los diferentes grupos experimentales (n=8): [*Grupo 1*: Lesión; *Grupo 2*: Lesión + EMT; *Grupo 3*: Lesión + Trasplante; *Grupo 4*: Lesión + Trasplante + EMT]. Una semana después, los animales del grupo 3 y 4 se trasplantaron con CCs, y un día después en los grupos 2 y 4 se inicio la estimulación magnética transcraneal [EMT]. Todos los grupos experimentales se inyectaron con un análogo de timidina [5-bromo-2'-deoxiuridina: BrdU; 50 mg/kg i.p, cada 12 hrs] los días 45 y 46 después de iniciados los tratamientos. Quince días después, se sacrificaron todos los animales y sus cerebros se seccionaron para determinar la incorporación de BrdU mediante un anticuerpo dirigido contra éste.

Inmunoreactividad a BrdU y TH

En ratas con lesión de la SNc que no recibieron ningún tratamiento, se observaron pocas células positivas a BrdU en la ZSV en relación al control. Cuando se examinaron los ventrículos laterales en los animales con lesión de la SNc que recibieron trasplante y/o EMT, se observó un incremento significativo en el número de células positivas a BrdU en

ambos ventrículos laterales. La proliferación celular se identificó por los núcleos positivos a BrdU presentes en la ZSV, teniendo como control positivo los observados en los plexos coroideos. Además, también se observaron células positivas a BrdU en el cuerpo calloso y en la extensión rostral de la ZSV, es decir, la vía migratoria rostral [VMR] al bulbo olfatorio (Peretto *et al.*, 1999). Esto indica, que una gran cantidad de CPN presentes en la ZSV incorporaron BrdU en la fase S del ciclo celular.

De las células TH⁺ observadas en la ZSV, muy pocas fueron BrdU⁺. La mayoría de estas células doblemente marcadas, se localizaron en la ZSV, muy pocas en el estriado adyacente a la pared del ventrículo [FIGURA 6]. Recordemos que la BrdU sólo estuvo disponible durante 2 días de los 60 días que duró el experimento, y que seguramente las células TH⁺ se están generando durante todo este tiempo.

Este resultado indica que algunas células TH⁺ observadas en la ZSV pudieran derivar de las CPN que proliferan en esta zona, las cuales se diferencian *in situ*, seguramente como respuesta a señales del estriado denervado y/o al trasplante de CCs. La EMT tiene efectos adicionales en la proliferación y diferenciación, mismos que están siendo determinados en este momento.

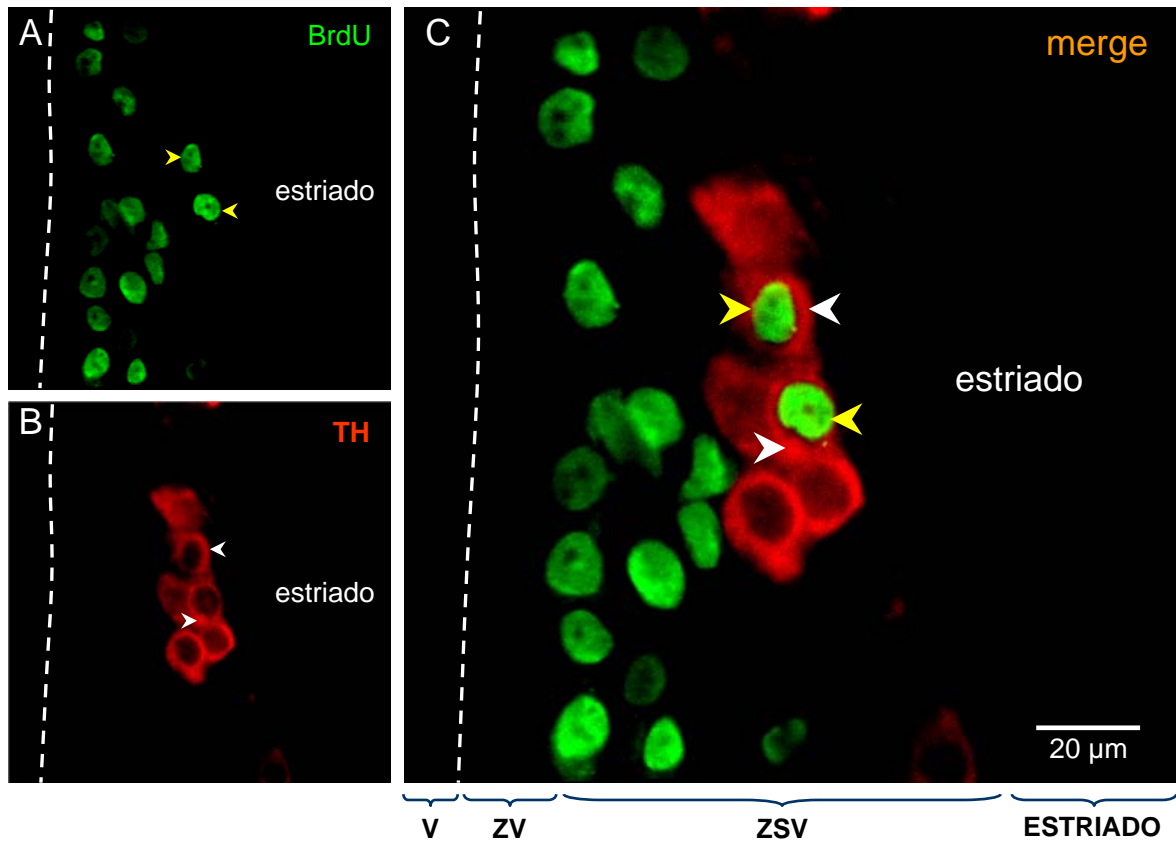


FIGURA 6 | **Nuevas células TH⁺ en la zona subventricular.** Micrografías obtenidas por microscopía confocal de una parte del ventrículo lateral izquierdo del cerebro de una rata con lesión de la SNc, trasplante de CCs y EMT. A: núcleos BrdU⁺. B: células TH⁺. C. Figura compuesta que resulta al unir la figura A con la B. Los núcleos BrdU⁺ predominan en la ZSV, Algunas células de reciente formación expresan también TH, lo cual confirma la hipótesis de que las células TH⁺ observadas en la ZSV, tienen su origen a partir de CPN presentes en esta zona.

Immunoreactividad a TH y NeuN

Para caracterizar el fenotipo de las células TH⁺ que se observan en la ZSV en respuesta a los diferentes tratamientos, se realizó doble inmunofluorescencia con TH y un anticuerpo anti-NeuN [marcador específico de neuronas] el cual se asocia a proteínas nucleares reguladas durante el desarrollo y terminación del ciclo celular (Mullen y col., 1992). Los resultados mostraron dos tipos de células TH: células TH⁺/NeuN⁺, indicando que son neuronas maduras [FIGURA 7] y células TH⁺/NeuN⁻, posiblemente en proceso de diferenciación.

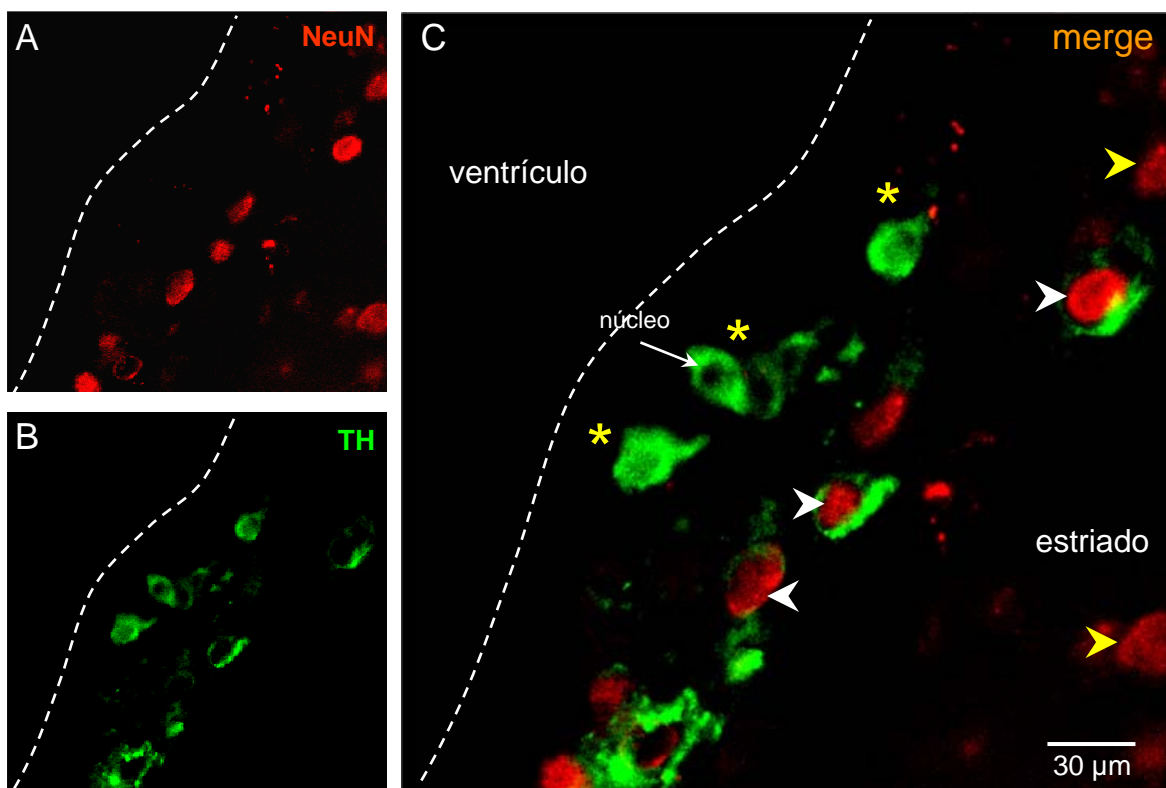


FIGURA 7 | Nuevas neuronas TH⁺ en la zona subventricular. Micrografía obtenida por microscopía confocal de una parte del ventrículo lateral izquierdo del cerebro de una ratona con lesión de la SN, trasplante de CCs y EMT. A: Núcleos NeuN⁺. B: células TH⁺. C. Figura compuesta resultado de unir la figura A con la B. Los núcleos NeuN⁺ predominan en el estriado, en la ZSV se observan dos poblaciones celulares, células TH⁺/NeuN⁺ [flechas] y TH⁺/NeuN⁻ [asteriscos].

Inmunoreactividad a TH y GFAP

Como parte de la estrategia para caracterizar el fenotipo de las células TH⁺ observadas en la ZSV dos meses después de los diferentes tratamientos, se decidió utilizar un marcador específico de células gliales, la GFAP [Proteína Ácida Glial Fibrilar]. La doble inmunoreactividad se realizó en todos los grupos [TH/GFAP]. Como puede observarse en la FIGURA 8, ninguna célula TH⁺ expresó la GFAP, lo cual ratifica su fenotipo neuronal.

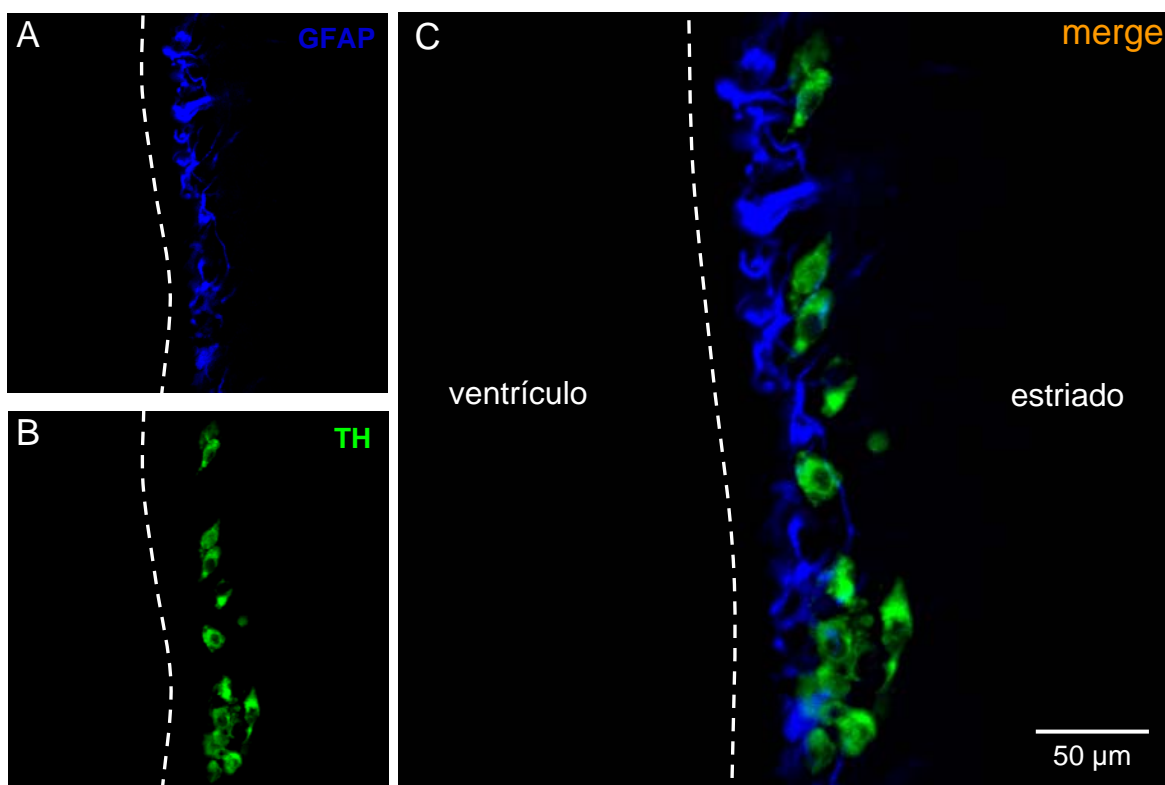


FIGURA 8 | Las células TH⁺ observadas en la zona subventricular no expresan GFAP. Micrografía obtenida por microscopía confocal de una parte del ventrículo lateral izquierdo del cerebro de una rata con lesión de la SNc, trasplante de CCs y EMT. A: células GFAP⁺. B: células TH⁺. C. Figura compuesta que resulta al unir la figura A con la B. Como puede observarse, ninguna célula TH⁺ expresa GFAP, lo cual descarta que se trate de células gliales.

Caracterización funcional de las células TH⁺ de la zona subventricular

Propiedades bioquímicas

Para determinar si las células TH⁺ que se observan en la zona subventricular [ZSV] presentan características de neuronas dopaminérgicas, se midió la liberación de dopamina en cortes seriados de esta zona. Como control del experimento, se utilizaron fragmentos proporcionales del estriado.

La microfotografía de la FIGURA 9 A muestra un corte coronal de 300 μm del cerebro de una rata control. En este corte se pueden observar diferentes estructuras, entre ellas: los ventrículos laterales, el estriado, el septum y el cuerpo calloso. La ZSV y un fragmento del estriado están delimitados por la línea roja. Estos fragmentos se disecaron para determinar la liberación de dopamina en todos los grupos experimentales [FIGURA 9 B y C].

La FIGURA 9 D muestra la liberación basal [liberación espontánea] e inducida [liberación por despolarización con KCl] de dopamina, la cual se obtuvo de los fragmentos del estriado en el grupo control. La primera barra representa la liberación basal [barra azul izquierda]. La barra roja muestra la liberación de dopamina inducida por 20 mM de KCl, y se puede observar que al inducirse la despolarización se incrementa la liberación de dopamina un 55% [p <0.001]. Sin embargo, en la barra verde se observa que en ausencia de Ca²⁺, el estímulo con 20 mM de KCl solo induce una liberación del 19% [p <0.001]. La concentración de dopamina liberada, se recuperó parcialmente al regresar los fragmentos

del estriado a la condición basal [barra azul derecha]. Estos datos son equivalentes a los reportados en la liberación Ca^{2+} -dependiente de acetilcolina en el estriado normal (Galaraga y col., 1999). Cabe mencionar que utilizamos la misma metodología.

En el estriado ipsilateral a la lesión de la SNc, puede observarse un déficit de dopamina del 70% en la liberación basal y 73% en la liberación inducida, en comparación con el estriado normal [FIGURA 9 E, $p < 0.004$ en ambos casos]. Sin embargo, aún con el estriado denervado se observó que la despolarización indujo un incremento del 64% en la liberación de dopamina respecto a la basal [FIGURA 9 E, barra roja]. También se puede observar una reducción significativa del 77% en la liberación de dopamina inducida por despolarización en ausencia de Ca^{2+} [FIGURA 9 E, barra azul].

Una vez que se estandarizó la metodología, se determinó la liberación de dopamina en la ZSV en los diferentes grupos experimentales. En la FIGURA 9 F, se puede observar que la liberación de dopamina se redujo un 80% en el estriado lesionado al compararse con el estriado control [$p < 0.001$]. Nuestros resultados están en relación con los reportes anatómicos, los cuales indican que la inervación dopaminérgica de la ZSV es menor en comparación a la mayor densidad que se observa en el estriado (Hoglinger y col., 2004). A pesar de esta reducción, la liberación de dopamina determinada en la ZSV, conserva los mismos patrones observados en el estriado. Así, la despolarización inducida por KCl aumentó un 60% la liberación de dopamina [$p < 0.003$] y se redujo en un ~87% en ausencia de Ca^{2+} externo [$p < 0.001$] (FIGURA 9 F).

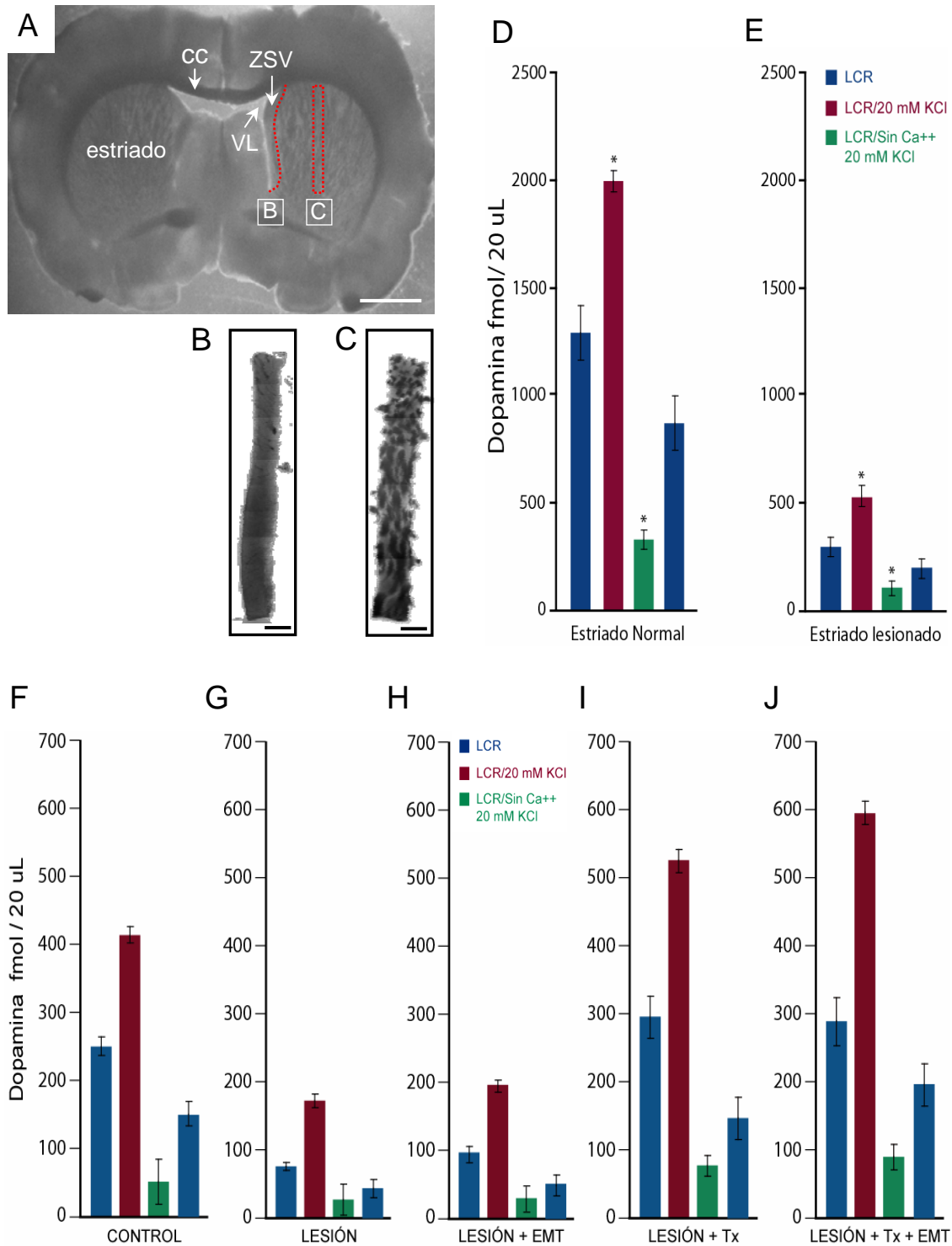


FIGURA 9 | **Concentración de dopamina en el estriado y en la zona subventricular.** A: Corte coronal del cerebro de una rata control. La ZSV [B] y un fragmento del estriado [C] están delimitados por la línea roja. Estos fragmentos se disecaron secuencialmente para determinar la liberación de dopamina en todos los grupos experimentales. D-E: Concentración de dopamina en el estriado. F-J: Concentración de dopamina en la ZSV.

En la FIGURA 9 G podemos observar que en la ZSV ipsilateral a la lesión de la SNc, la liberación de dopamina [basal e inducida] se redujo significativamente [$p < 0.001$]. En el grupo LESION + EMT, no se observaron diferencias significativas al compararse con el grupo lesionado [FIGURA 9 H]. Un resultado interesante se presentó cuando determinamos la liberación de dopamina en los fragmentos de la ZSV de los animales con lesión de la SNc que recibieron trasplante de células cromafines [FIGURA 9 I]. En este grupo, la concentración basal de dopamina se incrementó en un 18% [$p < 0.04$] y en un 27% [$p < 0.001$] al inducirse la liberación por despolarización, esto es comparado con los resultados obtenidos en el grupo control. Al determinarse la liberación de dopamina en ausencia Ca^{2+} externo, se observó una reducción del 85% [$p < 0.001$]. Estos resultados sugieren que las células TH^+ que observamos en la ZSV [FIGURA 3], las cuales se generan en respuesta a los diferentes tratamientos, pueden ser las responsables del incremento observado en la liberación de dopamina. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de dopamina determinada en el grupo LESION + TRASPLANTE + EMT, esto al compararse con el grupo LESION + TRASPLANTE [FIGURA 9 J].

Propiedades electrofisiológicas

Con el objetivo de obtener una mayor probabilidad de registrar una célula inmunoreactiva a TH en la ZSV, el estudio electrofisiológico se realizó en ratas con lesión de la SNc que recibieron trasplante de células cromafines. En este grupo experimental se cuantificaron 241.3 ± 15.1 células TH⁺ en 500µm de extensión vertical de la ZSV (Arias-Carrión y col., 2004). Dos meses después del trasplante, los animales se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron cortes coronales seriados de su cerebro [FIGURA 9 A]. Las rebanadas obtenidas contienen los ventrículos laterales, el estriado ipsilateral a la lesión de la SNc, así como la zona de trasplante. Todos los registros se realizaron en la ZSV ipsilateral a la lesión. El grupo control se registró bajo las mismas condiciones, en este grupo también se realizaron registros en la SNc.

Bajo estas condiciones, se logró registrar un total de 87 células en la ZSV. Durante el protocolo de registro, la célula se marcó para su identificación con biocitina. Una vez concluido el registro, la rebanada se fijó con paraformaldehído al 4% y posteriormente se procesó para inmunofluorescencia a TH. Los resultados mostraron que ~54% de las células registradas fueron TH⁺ [n = 47/87]. De las 47 células TH⁺ registradas en la ZSV, solo 5 presentaron potenciales de acción [~11%]. Por otro lado, de las 42 células registradas que no fueron inmunoreactivas a TH, 8 presentaron potenciales de acción (datos no mostrados). Además se registraron 30 células en el grupo control y no se encontró inmunoreactividad a TH, ni se registraron potenciales de acción.

La FIGURA 10 muestra las microfotografías obtenidas por microscopía confocal después del registro. En ellas puede observarse el ventrículo lateral, la zona subventricular y el estriado ipsilateral a la lesión de la SNc. La FIGURA 10 A, identifica la célula registrada marcada con biocitina [asterisco]. La FIGURA 10 B muestra la inmunoreactividad a TH en el mismo campo; en ella pueden observarse cuatro células TH⁺. La superposición de las microfotografías demuestra que la célula registrada no es TH⁺ [FIGURA 10 C]. La FIGURA 10 D muestra que la célula TH⁻ registrada en la ZSV no presentó potenciales de acción al inducirse la despolarización. Al inyectarse una mayor corriente despolarizante, sólo se observó una espiga rudimentaria al principio del pulso [flecha].

Estos registros electrofisiológicos obtenidos en la ZSV son iguales a los reportados en células progenitoras neuronales y neuroblastos presentes en la ZSV y en la vía migratoria rostral [VMR] de animales control (Wang y col., 2003; Belluzzi y col., 2003).

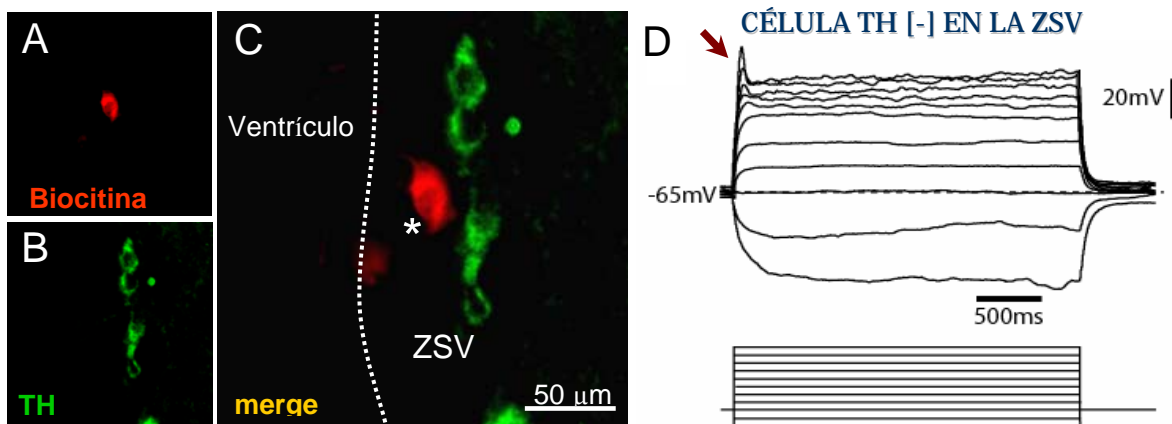


FIGURA 10 | Propiedades electrofisiológicas de las células registradas en la ZSV que no fueron inmunoreactivas a TH. A-C: Micrografía confocal obtenida de una rata con lesión de la SNc y trasplante de CC. **A:** Células registrada marcada con biocitina. **B:** inmunoreactividad a TH. **C:** la superposición de las microfotografías demuestra que la célula registrada no es TH⁺. **D:** la célula TH⁻ registrada en la ZSV no presentó potenciales de acción al inducirse la despolarización. Al inyectarse una mayor corriente despolarizante, solo se observó una espiga rudimentaria al principio del pulso [flecha].

Algunas células TH⁺ registradas en la ZSV presentaron potenciales de acción

Como ya se comentó, sólo un 11% de las células TH⁺ registradas en la ZSV [n=5/47] presentaron potenciales de acción. Un ejemplo se muestra en la FIGURA 11. Las microfotografías obtenidas por microscopía confocal muestran que la célula marcada con biocitina es también una célula TH⁺. La FIGURA 11 D muestra que la inyección de un pulso despolarizante indujo potenciales de acción de forma regular y de frecuencia baja [<10 Hz], así como una deflexión tiempo-dependiente [sag] al hiperpolarizarse la membrana [flecha]. Las células TH⁺ registradas en la ZSV presentaron potenciales de acción a intervalos regulares, posteriormente se presentó una despolarización pequeña como resultado de la corriente actual [FIGURA 11 A], con un umbral de alrededor de -40 ± 4 mV [n=5]. Al final del registro del potencial de acción se observó una hiperpolarización de la membrana [AHPs] con una amplitud máxima de 21 ± 2.3 mV (n=4) y 100-500 ms de duración. Estos AHPs son bifásicos, de inicio breve, con un componente creciente rápido, seguido por otro duradero de componente lento [FIGURA 11 A]. Estas propiedades electrofisiológicas, son similares a las reportadas en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta [SNc] (Grace y Bunney, 1983a, 1983b, 1984a, 1984b; Grace y Onn, 1989; Tepper y col., 1987). Las células TH⁺ observadas en la ZSV también presentaron una deflexión característica en la fase creciente del potencial de acción [FIGURA 11 B]. La FIGURA 11 C ilustra un registro realizado en una neurona dopaminérgica de la SNc, en el cual puede observarse una deflexión similar [flecha], que en este caso, es el resultado de un retraso entre la activación de un segmento proximal de la neurona y el inicio del potencial de acción somato-dendrítico (Grace y Bunney, 1983b).

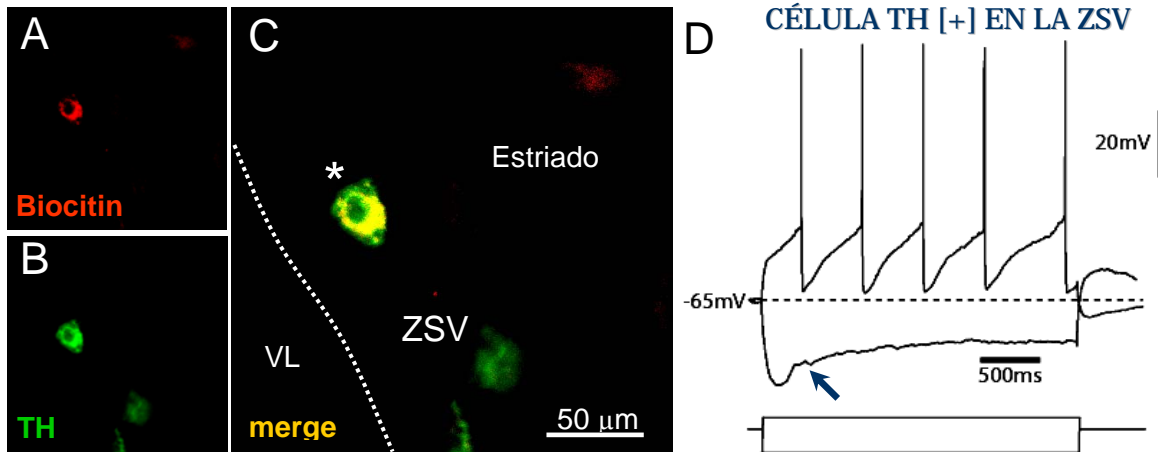


FIGURA 10 | **Propiedades electrofisiológicas de las células TH⁺ registradas en la ZSV en ratas con lesión de la SNc y trasplante de células cromafines.** A: célula marcada con biocitina. B: Inmunoreactividad a TH. C: La superposición de las micrográficas demuestra que la célula registrada es TH⁺ [*]. D: potenciales de acción regulares y de baja frecuencia registrados en esta célula. Además, se observaron propiedades electrofisiológicas presentes en las neuronas dopaminérgicas de la SNc, como una deflexión tiempo-dependiente [sag] al hiperpolarizarse la membrana [flecha].

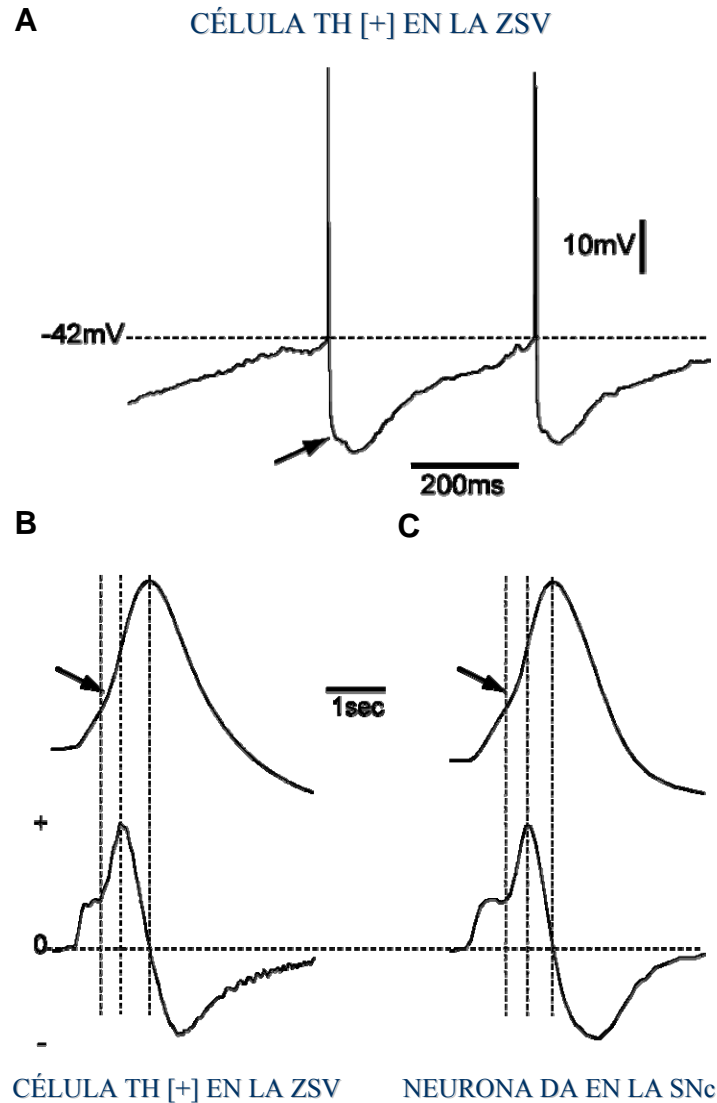


FIGURA 11 | **Comparación de los potenciales de acción obtenidos en células TH⁺ de la ZSV y neuronas dopaminérgicas de la SNc.** **A:** registro obtenido por fijación de corriente en una célula TH⁺ de la ZSV. Se muestran potenciales de acción regulares en respuesta a la inyección de pequeños pulsos despolarizantes. Los intervalos inter-espiga muestran corrientes hiperpolarizantes duraderas [flecha]. **B:** potencial de acción registrado en una célula TH⁺ de la ZSV. La derivada de este registro se muestra debajo. La flecha indica la deflexión en la fase creciente del potencial de acción, el cual puede verse claramente en la derivada. **C:** potencial de acción registrado en una neurona dopaminérgica de la SNc. Su derivada también se muestra. Note las similitudes entre ambos registros, incluso en la deflexión observada en la fase creciente del potencial de acción.

Una comparación más detallada de las propiedades electrofisiológicas encontradas entre las células TH⁺ registradas en la ZSV y las neuronas dopaminérgicas de la SNc se muestra en FIGURA 12. La columna izquierda [A] ilustra las propiedades de membrana de una célula TH⁺ de la ZSV y la columna derecha [B] ilustra la respuesta de una neurona dopaminérgica de la SNc. Las células recibieron pulsos despolarizantes de 2 segundos de duración, los cuales se fueron incrementando en intensidad [FIGURA 12 A-C]. Se puede observar que una despolarización débil origina trenes de potenciales de acción de baja frecuencia, e incluso pueden observarse algunas fallas en el desarrollo del potencial de acción [FIGURA 12 A-B]. La despolarización moderada, genera trenes de potenciales de acción de mayor frecuencia [FIGURA 12 C]. La frecuencia de disparo se incrementó con pulsos de despolarización más fuertes, pero el disparo no se mantuvo hasta el final del estímulo [bloqueo de disparo; FIGURA 12 C]. La relación intensidad-frecuencia [I-F] se mantuvo en los dos tipos de células como puede observarse en la FIGURA 12 E y J. La frecuencia más alta que alcanzaron las células TH⁺ de la ZSV fue de 8.9 ± 0.9 Hz [n=4]. La relación I-F obtenida en la neurona dopaminérgica de la SNc fue muy similar a la célula TH⁺ de la ZSV [FIGURA 12 E y J]. En ambos casos, la frecuencia no fue mayor a ~10 Hz.

Como se mostró anteriormente, las células TH⁺ de la ZSV presentan una deflexión voltaje dependiente [sag] como respuesta a la inyección de corriente hiperpolarizante [FIGURA 10 D]. Este sello electrofisiológico también es una característica de las neuronas dopaminérgicas (Lacey et al. 1989; Grace y Onn, 1989). La FIGURA 13 A Y E ejemplifica un registro de voltaje obtenido en una célula TH⁺ de la ZSV y una neurona de la SNc como respuesta a la despolarización e hiperpolarización. La relajación producida después de la inyección de la corriente hiperpolarizante se indica con los asteriscos. La despolarización

de rebote después del fin de la hiperpolarización es evidente en ambos registros. Posteriormente, las mismas células se registraron con la técnica de fijación de voltaje, encontrándose trazos de corriente en respuesta a la corriente despolarizante. La FIGURA 13 B ejemplifica trazos de corrientes obtenidos de una célula TH⁺ de la ZSV en respuesta a comandos de voltaje despolarizantes e hiperpolarizantes. La FIGURA 13 F muestra el registro obtenido de una neurona dopaminérgica de la SNc. Los pulsos de voltaje despolarizante fuera de corriente y los pulsos obtenidos con fijación de corriente, considerando que la corriente de inversión se activa lentamente, se desarrolla como respuesta a la corriente hiperpolarizante [*].

En el curso temporal y voltaje dependiente de la corriente de inversión registrada en la célula TH⁺ de la ZSV aparece una corriente catiónica activada por hiperpolarización [corriente HCN], la cual se ha caracterizado en neuronas dopaminérgicas y otro tipo de neuronas (Mercuri y col., 1995; Watts y col., 1996). Una aplicación de Boltzmann para diferenciar la curva IV de la corriente de inversión registrada en células de TH⁺ de la SVZ [FIGURA 13 D] mostró los siguientes parámetros: umbral de voltaje = -74 ± 4.2 mV; voltaje de activación; $V_{\text{half}} = -93 \pm 2.8$ mV y conductancia de la cresta; $G_{\text{max}} \sim 18$ nS [n=5]. Los mismos parámetros se obtuvieron en las neuronas dopaminérgicas de la SNc [FIGURA 13 H]: -73 ± 5 mV; -98 ± 6 mV y ~ 16 nS, respectivamente [n=6]. Se han reportado valores similares en otros estudios realizados en neuronas dopaminérgicas de la SNc (Mercuri y col., 1995; Whatts y col., 1996).

CÉLULA TH [+]⁺ EN LA ZSV

NEURONA DA EN LA SNC

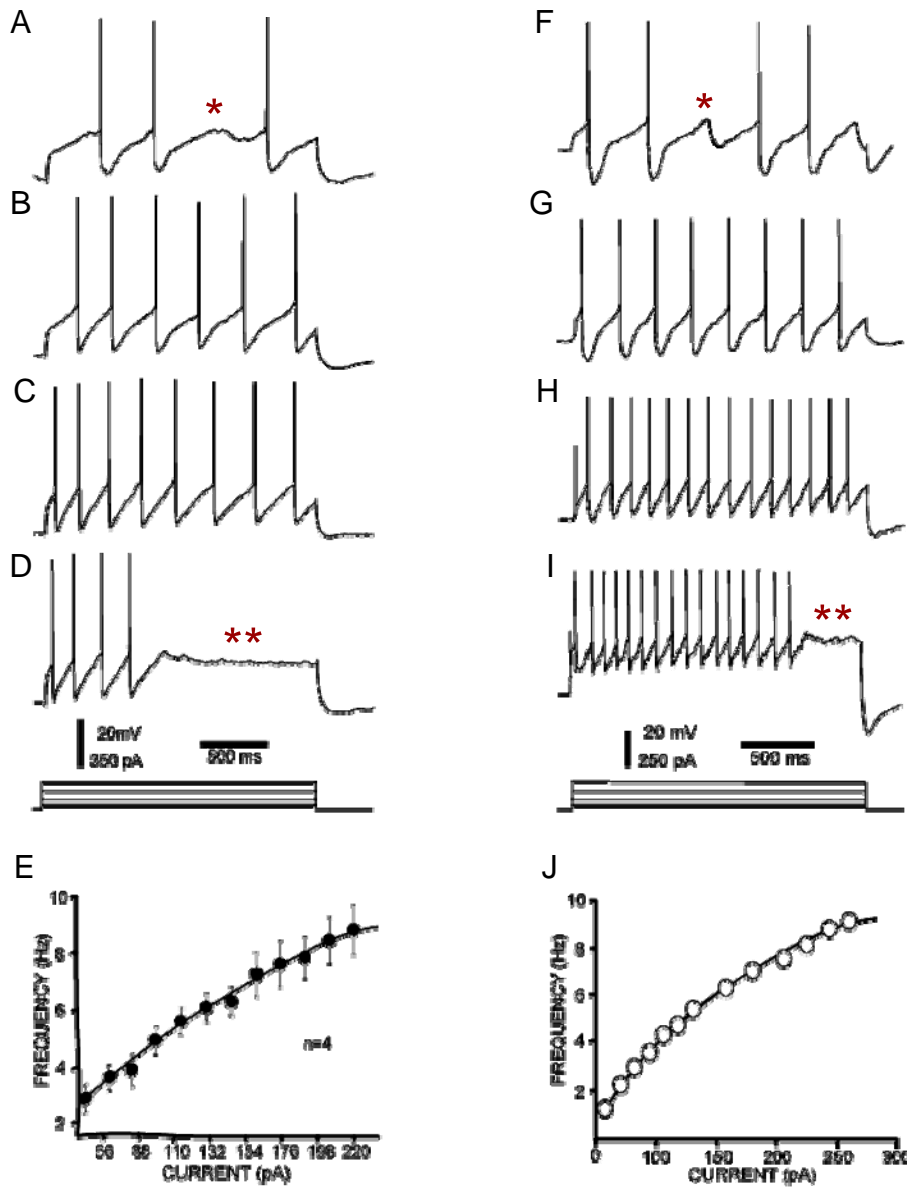
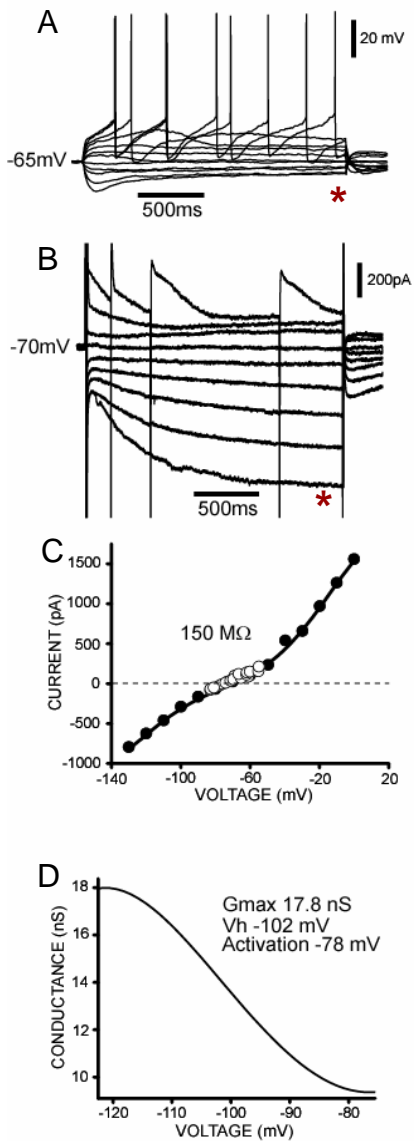


FIGURA 12 | **Relación intensidad-frecuencia entre las células TH⁺ de la ZSV y las neuronas dopaminérgicas de la SNC.** A-D: Trazos representativos de los potenciales de acción registrados en una célula TH⁺ de la ZSV en respuesta a 2 sec de corriente despolarizante de intensidad creciente [el protocolo de registro se muestra al fondo]. La célula muestra fallas en el desarrollo de los potenciales de acción por despolarizaciones débiles [*] y presenta bloqueo de disparo por estímulos de mayor intensidad [**]. E. Relación intensidad-frecuencia [IF] obtenida con el registro completo de la célula TH⁺ de la ZSV. F-I: Trazos representativos de los potenciales de acción registrados en una neurona dopaminérgica de la SNC en respuesta a un protocolo igual al realizado a la célula TH⁺ de la ZSV. La neurona dopaminérgica de la SNC también muestra las fallas en el desarrollo de los potenciales de acción por despolarizaciones débiles [*], y el bloqueo de disparo en respuesta a estímulos de mayor intensidad [**]. J: Relación intensidad-frecuencia de la neurona dopaminérgica de la SNC.

Es interesante hacer notar que, los registros obtenidos en ambas poblaciones celulares son casi indistinguibles. Las diferencias que podemos notar, son una corriente de inversión mas grande y una corriente exterior persistente inducida por los comandos de despolarización en las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Finalmente, en la FIGURA 13 C Y G se ilustra la relación corriente-voltaje [curva I-V], obtenida en los registros mostrados en la FIGURA 13 A Y E [círculos blancos], y los registros de corriente mostrados en la FIGURA 13 B Y F [círculos negros]. Nótese la superposición de los datos al momento del potencial de reposo de la célula, y las similitudes en la curva I-V en ambos tipos celulares. A partir de esta curva I-V, se obtuvo la conductancia recíproca mínima: La media de la resistencia de entrada [R_{in}] determinada en las células TH⁺ de la ZSV fue de $156 \pm 1 \text{ M}\Omega$ [n=5], mientras en las neuronas de la SNc fue de $160 \pm 5 \text{ M}\Omega$ [n=6].

CÉLULA TH⁺ EN LA ZSV



NEURONA DA EN LA SNc

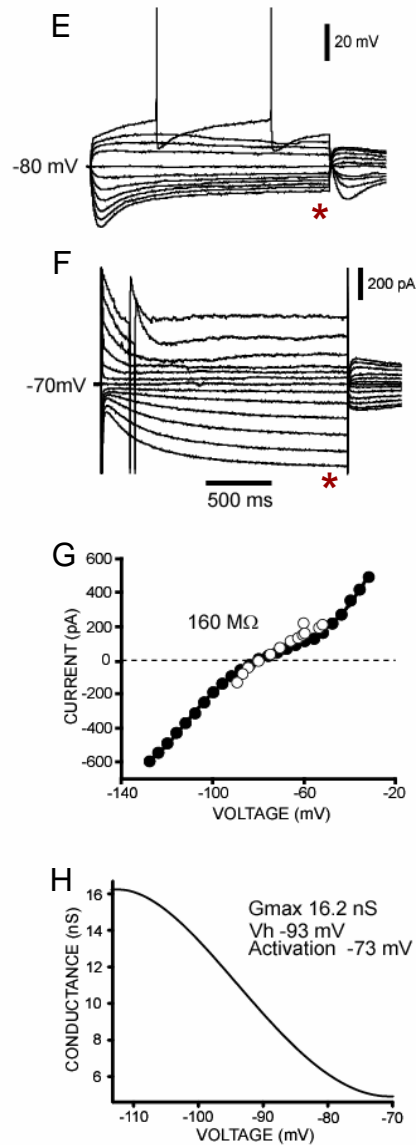


FIGURA 13 | **Relación corriente-voltaje de las células TH⁺ de la ZSV y las neuronas dopaminérgicas de la SNc.** Registros de voltaje obtenidos de una célula TH⁺ de la ZSV [A] y una neurona de la SNc [E], en respuesta a la inyección de corrientes despolarizantes e hiperpolarizantes. Los registros se obtuvieron con el protocolo utilizado para la fijación de corriente. B,F: Registros de corriente obtenidos en las mismas células mostradas en A y E, en respuesta a cambios hiperpolarizantes y despolarizantes de voltaje. El voltaje se fija a -70 mV. En el curso temporal y voltaje dependiente se observa una corriente de inversión. C,G: Muestra la relación corriente-voltaje [IV] obtenida de los registros mostrados en A y D, B y F. Los círculos vacíos corresponden a los registros de voltaje [A,E], los círculos cerrados a los registros de corriente [B,G]. Se puede observar la similitud entre las dos células. D,H: La aplicación de Boltzmann permite diferenciar la curva IV de la corriente de inversión registrada.

Corrientes sinápticas espontáneas registradas en las células TH⁺ de la ZSV

Con base en los resultados previos, decidimos investigar si las células TH⁺ registradas en la ZSV reciben proyecciones que las integran a la red neuronal del cerebro huésped. Para ello, utilizando la técnica de fijación de voltaje se registraron los eventos postsinápticos espontáneos. No se observaron corrientes sinápticas espontáneas [con o sin 4-aminopiridina] en las células registradas en la ZSV que fueron TH⁻ o TH⁺ que no presentaron potenciales de acción [n=7]. Sin embargo, en los registros obtenidos en células TH⁺ registradas en la ZSV [n=3] las cuales presentaron potenciales de acción [FIGURA 14 A], se observaron corrientes sinápticas espontáneas. La frecuencia de estos eventos se incrementó después de la aplicación de 100 μM de 4-aminopiridina (4-AP) [FIGURA 14 B]. En la FIGURA 14 C, se muestra una amplificación de los eventos sinápticos espontáneos antes y después de la administración de 4-AP. Estos resultados sugieren fuertemente que las células TH⁺ de la ZSV, además de presentar diversas características electrofisiológicas de las neuronas dopaminérgicas de la SNc también reciben aferencias sinápticas de las redes neuronales vecinas.

CÉLULA TH⁺ EN LA ZSV

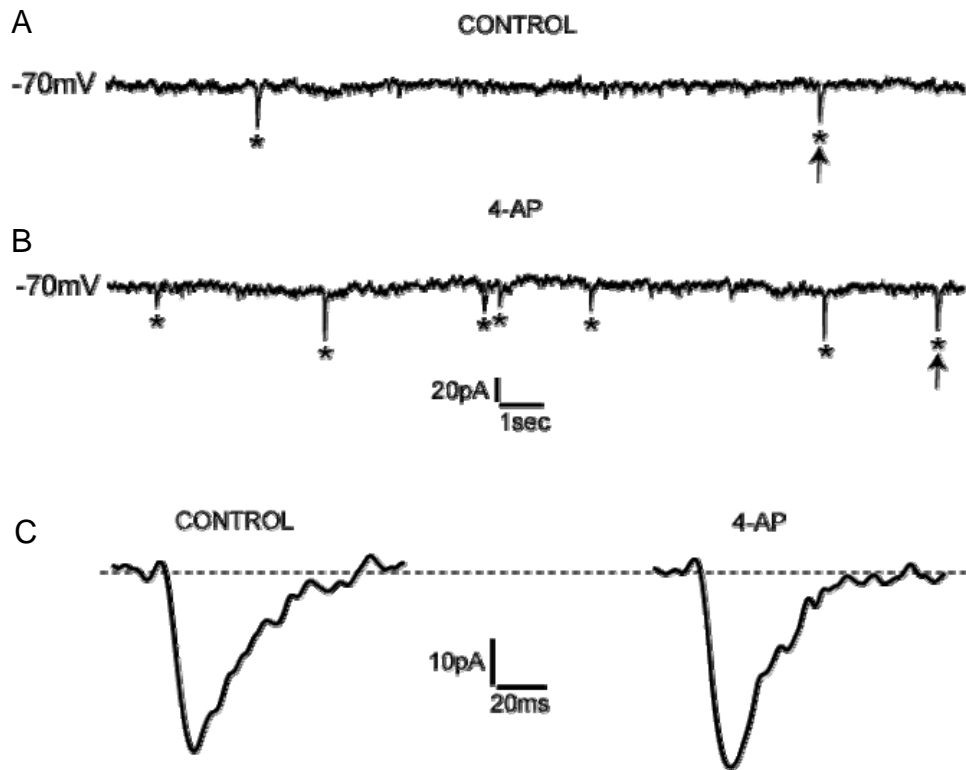


FIGURA 14 | **Potenciales postsinápticos espontáneos en células TH⁺ excitables de la ZSV.** Los registros se obtuvieron utilizando la técnica de fijación de voltaje [-70 mV]. A: Las células TH⁺ registradas en la ZSV que presentaron potenciales de acción, mostraron también corrientes sinápticas espontáneas. B: La frecuencia de estos eventos se incremento después de la aplicación de 100 μ M de 4-AP. C: Amplificación de los eventos sinápticos espontáneos antes y después de la administración de 4-AP. La administración de 4-AP no afecta la cinética de los potenciales sinápticos.

DISCUSIÓN

Resultados de las pruebas conductuales

Nuestro estudio ha permitido demostrar que la asimetría motora que se observa en los animales con lesión de la SNc al ser inyectados con D-anfetamina, se incrementa después de dos meses en los animales que no recibieron ningún tratamiento. Este deterioro se previene cuando son tratados con EMT (Arias-Carrión y col., 2004), y como ya se había demostrado, se presenta una recuperación funcional después del trasplante de CCs (Freed y col., 1981). En aquellos animales que además del trasplante de CCs se sometieron a EMT se observó una recuperación adicional (Arias-Carrión y col., 2004). Sin embargo, hasta este momento no conocemos si esto se debe a la neurogenización de las CCs, o a un efecto adicional de la EMT.

Estudios realizados en modelos animales y pacientes con EP, apoyan el potencial terapéutico de la EMT. Por ejemplo, en ratas con lesión de la SNc inducida por la administración estereotáxica de 6-OHDA, las cuales son expuestas durante 14 días a EMT, se reduce la hipersensibilidad asociada a la denervación (Sieron y col., 2001). Pacientes con EP, han mostrado una mejoría significativa de los síntomas parkinsonianos hasta por 6 meses después de la estimulación magnética transcranial repetitiva [EMTr], la cual se aplicó diariamente por 10 días (Mally y Stone, 1999). Otros estudios clínicos se han realizado utilizando EMTr como posible tratamiento de la disfunción motora que presentan los pacientes con EP (Shimamoto y col., 2001; Cantello y col., 2002). Hasta ahora, los

resultados han sido variables, pero se ha generado un gran interés por desarrollar experimentos en los cuales se utilicen controles apropiados.

Neurogénesis en la ZSV en ratas con lesión de la SNc, trasplante de CCs y/o EMT

De acuerdo a nuestro conocimiento, la inducción de neurogénesis en la zona subventricular [ZSV] después de la lesión de la SNc, trasplante de CCs y/o EMT no se había reportado (Fallon y col., 2000; Cooper e Isaacson., 2004). La destrucción de la SNc y la consecuente denervación dopaminérgica en el estriado (Zhou y col., 1996), pueden inducir señales tróficas similares a las que se presentan después de la isquemia inducida por la oclusión de la arteria cerebral media, la cual se ha demostrado que incrementa la neurogénesis en la ZSV (Arvidsson y col., 2002; Yamashita y col., 2006). De igual forma, el trasplante de CCs podría incrementar la proliferación y diferenciación de las CPN presentes en la ZSV de las siguientes formas: 1) Producción de señales tróficas locales debidas a la lesión ocasionada por el trasplante; y 2) Liberación local de moléculas neurotróficas por las CCs trasplantadas (Kriegstein y Unsicker, 1997). Por lo cual, consideraríamos que estas señales deberían tener un mayor efecto en la ZSV ipsilateral a la lesión y/o trasplante (Fallon et al., 2000). Sin embargo, los efectos sobre la neurogénesis de la SVZ se observaron en ambos ventrículos laterales, lo cual sugiere que otros estímulos pueden estar participando.

Los campos magnéticos de extrema baja frecuencia [CM-EBF] influyen sobre diferentes sistemas biológicos generando campos eléctricos, modificando la permeabilidad de las membranas y catalizando reacciones que implican la formación de radicales libres

(Levin, 2003). Los CM-EBF son responsables de la diferenciación neuronal de las CCs *in vitro* e *in vivo* (Drucker-Colín y col., 1994; Feria-Velasco-Velasco y col., 1998; Arias-Carrión y Drucker-Colín 2006). Se conoce que los campos bioelectromagnéticos endógenos transportan información morfogenética durante el desarrollo embrionario y durante la regeneración de tejidos (Levin, 2003; Nuccitelli, 2003). Por ejemplo, la aplicación exógena de campos magnéticos induce la regeneración de la médula espinal, mientras que la inhibición de los campos magnéticos endógenos la inhibe. Las células precursoras de la cresta neural detectan y responden a señales eléctricas (Gruler y Nuccitelli, 2003). Hasta el momento, se desconoce la participación de los campos eléctricos endógenos sobre la proliferación, migración y diferenciación de las células progenitoras neuronales [CPN] presentes en la ZSV. La EMT podría incrementar la neurogénesis al modificar los campos eléctricos endógenos.

Diferenciación in situ de CPN de la ZSV

Las CPN que proliferan en la ZSV migran a través de la vía migratoria rostral migratoria [VRM] hacia el bulbo olfatorio [BO], donde se diferencian en interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Doetschet y col., 1997; Luskin, 1998). Éstos precursores nunca se diferencian en la ZSV o en la VMR; alcanzan su madurez cuando se integran en el BO (Wang y col., 2003; Belluzzi y col., 2003; Carleton y col., 2003).

La tirosina hidroxilasa [TH] es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Por lo cual, existe un gran interés en estudiar la regulación y expresión de esta enzima en

las regiones cerebrales en las cuales se induce depleción de dopamina. Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado diversas estrategias para restaurar la función dopaminérgica (Drucker-Colín y Verdugo-Díaz, 2004); en este sentido, el hallazgo de la presencia de células TH⁺ en la ZSV es de enorme relevancia. Estas células no se observan en animales control, por lo que su presencia en los animales tratados, sugiere que derivan de CPN que proliferan en la ZSV (Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Esta hipótesis se ha demostrado mediante la administración de BrdU, la cual se incorpora a la célula en la fase S del ciclo celular. En estos experimentos, se encontró que algunas de las CPN que proliferan en la ZSV se diferencian *in situ* en células TH⁺. Algunas de las nuevas células TH⁺ coexpresan NeuN, pero ninguna GFAP.

Por otro lado, se ha identificado un subtipo de interneuronas dopaminérgicas intrínsecas en el estriado de humanos y primates (Porritt y col., 2000). Estas neuronas TH⁺ coexpresan el transportador de dopamina, lo que sugiere que son capaces de presentar neurotransmisión dopaminérgica (Betarbet y col., 1997). De forma interesante, el número de células dopaminérgicas observadas en el estriado, se incrementa significativamente en monos en los que se indujo la denervación del estriado con MPTP (Betarbet et al, 1997; Palfi y col., 2002), y en los cerebros de pacientes que presentaron EP (Porritt y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que las nuevas neuronas dopaminérgicas observadas en los monos tratados con MPTP, resultan de un cambio en el fenotipo de las interneuronas GABAérgicas preexistentes y no de neurogénesis como se pensaba (Tandé y col., 2006). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las CPN que proliferan en la ZSV se diferencian *in situ* en neuronas dopaminérgicas. Por lo cual, la presencia de estas células en

una de las zonas neurogénicas, representa una respuesta del cerebro adulto a la depleción dopaminérgica (Arvidsson y col., 2004; Tandé y col., 2006).

Nuevas neuronas dopaminérgicas en la ZSV

Una de las características distintivas de las neuronas es su capacidad para generar potenciales de acción, es decir excitabilidad (Reh, 2002). El potencial de acción surge de los cambios secuenciales de la permeabilidad selectiva de la membrana celular a los iones de Na^+ y K^+ (Spitzer y col., 2002). Los precursores neuronales comienzan su diferenciación cuando salen del ciclo celular. La adquisición de canales iónicos es una parte crucial de la diferenciación, pues tales canales (i) se requieren para la excitabilidad y (ii) tienen una función básica en la maduración morfológica y funcional de las neuronas y por ende de las redes neuronales (Zhang y Poo, 2001; Spitzer y col., 2002; Ben-Ari y col., 2004). En el desarrollo del cerebro, los canales iónicos participan en la migración celular (Komuro y Rakic, 1998; Marin y Rubenstein, 2003), el crecimiento neurítico (Chemin y col., 2002), la dirección axonal (Catalano y Shatz, 1998; Dantzker y Callaway, 1998), la forma del potencial de acción (Spitzer y col., 2002), la especificación del neurotransmisor (Borodinsky y col., 2004; Spitzer y col., 2004) y la supervivencia neuronal (Mennerick y Zorumski, 2000; Salthun-Lassalle y col., 2004). Los progenitores neuronales residentes en la ZSV del cerebro adulto no expresan canales de Na^+ ni K^+ , es hasta su diferenciación e integración en el bulbo olfatorio donde los expresan, por ende es hasta estas etapas cuando desarrollan potenciales de acción y liberan dopamina (Carleton y col., 2003).

Los resultados bioquímicos muestran una menor concentración de dopamina en la ZSV en comparación con un fragmento proporcional del estriado. Este resultado demuestra que la ZSV recibe una menor inervación dopaminérgica (Höglinger y col., 2004). Los niveles de dopamina determinados en la ZSV de animales con lesión de la SNc mostraron una reducción significativa en relación al grupo control. En los animales con lesión de la SNc que fueron trasplantados con CCs, se presentó un incremento significativo en la concentración de dopamina en esta zona, incluso fue mayor a la determinada en los animales control. Esto último sugiere que las nuevas células TH⁺ observadas en la ZSV pudieran ser las responsables de este incremento.

Los registros electrofisiológicos explican parcialmente por que la liberación de dopamina, determinada en los fragmentos de la ZSV de animales con lesión de la SNc y trasplante de CCs, fue tan baja. La mayoría de las células TH⁺ registradas en la ZSV no presentaron potenciales de acción. Los registros obtenidos en la ZSV de animales control mostraron que las CPN presentan propiedades electrofisiológicas de neuronas inmaduras (Wang, 2003; Belluzzi y col., 2003). En contraste, el presente trabajo demuestra que el 11% de las células TH⁺ registradas en la ZSV de animales con lesión de la SNc que recibieron trasplante de CCs, presentaron potenciales de acción. Por lo cual, es posible especular que las CPN predestinadas a convertirse en interneuronas dopaminérgicas en la capa periglomerular del BO presentaron una diferenciación ectópica en la ZSV. Sin embargo, las propiedades electrofisiológicas que presentan las células TH⁺ registradas en la ZSV, difieren considerablemente de los registros reportados en las interneuronas de la capa periglomerular del BO. Estas células responden a la corriente despolarizante generando un solo potencial de acción seguido de una larga meseta. Además, la curva IV muestra una

pequeña corriente exterior de rectificación (Puopolo y Belluzzi, 1998; Belluzzi y col., 2003). Las propiedades electrofisiológicas de las células TH⁺ registradas en la ZSV son muy parecidas a las que presentan las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, las cuales difieren considerablemente de las neuronas preexistentes en el estriado. Sin embargo, la posibilidad de una diferenciación ectópica prematura de los precursores que darán origen a las interneuronas periglomerulares no se puede descartar completamente. Algunas de las células registradas en la ZSV que presentaron potenciales de acción no fueron inmunoreactivas a TH. Por lo tanto, cabe la posibilidad de haberse registrado células propias del estriado, o bien, la expresión de TH ocurre más lentamente que la aparición de excitabilidad de la membrana. Estos hallazgos correlacionan con los resultados previos que indican que las interneuronas periglomerulares presentan potenciales de acción antes de ser inmunoreactivas a TH (Belluzzi y col., 2003).

CONCLUSIONES

La investigación generada en los últimos años, ha permitido aceptar que nuevas neuronas continúan generándose en el cerebro adulto de mamíferos. La importancia funcional de las nuevas neuronas está aún bajo investigación. Sin embargo, existen resultados sorprendentes, los cuales indican que las nuevas neuronas se integran al cerebro adulto y participan en diferentes procesos cognoscitivos. Además, se ha despertado un gran interés en la neurogénesis del cerebro adulto por las potenciales aplicaciones terapéuticas.

Hasta este momento, nuestros resultados indican que la lesión de la SNc induce que las CPN presentes en la ZSV se diferencien *in situ* en células TH⁺ que coexpresan marcadores neuronales de células dopaminérgicas (Arias-Carrión y col., 2004, 2006).

Estas nuevas células TH⁺ posiblemente se integran a la red neuronal, liberan dopamina y se comportan eléctricamente como neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que nos permitan entender los mecanismos celulares y moleculares que inducen la diferenciación *in situ* de las CPN de la ZSV. Esto nos permitirá desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en diversas enfermedades neurodegenerativas.

Neurogenesis in the Subventricular Zone Following Transcranial Magnetic Field Stimulation and Nigrostriatal Lesions

O. Arias-Carrión,¹ L. Verdugo-Díaz,² A. Feria-Velasco,³ D. Millán-Aldaco,¹ A.A. Gutiérrez,⁴ A. Hernández-Cruz,⁵ and R. Drucker-Colín^{1*}

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., México

²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., México

³Unidad de Morfología de Alta Resolución; CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

⁴Unidad de Terapia Celular, Centro Nacional de Rehabilitación, México D.F., México

⁵Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., México

Neurogenesis continues at least in two regions of the mammalian adult brain, the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone in hippocampal dentate gyrus. Neurogenesis in these regions is subjected to physiological regulation and can be modified by pharmacological and pathological events. Here we report the induction of neurogenesis in the SVZ and the differentiation after nigrostriatal pathway lesion along with transcranial magnetic field stimulation (TMFS) in adult rats. Significant numbers of proliferating cells demonstrated by bromodeoxyuridine-positive reaction colocalized with the neuronal marker NeuN were detected bilaterally in the SVZ, and several of these cells also expressed tyrosine hydroxylase. Transplanted chromaffin cells into lesioned animals also induced bilateral appearance of subependymal cells. These results show for the first time that unilateral lesion, transplant, and/or TMFS induce neurogenesis in the SVZ of rats and also that TMFS prevents the motor alterations induced by the lesion.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: subventricular zone; grafts; magnetic fields; substantia nigra lesions; brain insults

Studies both in animal models of Parkinson's disease (PD) and in PD patients argue in favor of a possible therapeutic potential of transcranial magnetic field stimulation (TMFS). For instance, rats with chemical damage of the central dopaminergic system (a standard animal model of PD), reduced significantly their dopamine hypersensitivity-associated behavior after 14 days of exposure to extremely-low-frequency magnetic fields (Sieron et al., 2001). Similarly, PD patients subjected to repetitive transcranial magnetic stimulation daily for 10 days had improved Parkinsonian symptoms for up to 6 months (Mally and Stone, 1999). Aside from this, there is an extensive literature showing effects of magnetic fields on biological systems (Ahlborn and Feychting, 2003).

Neurogenesis occurs in discrete regions of the adult mammalian brain, such as the hippocampal dentate gyrus

and the forebrain subventricular zone (SVZ). Neuronal precursors persist and continue to proliferate in the adult rodent forebrain SVZ (Hinds, 1968; Altman, 1969; Kaplan and Hinds, 1977; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Thomas et al., 1996). Neurogenesis in these regions is subjected to physiological regulation (Cameron and McKay, 1999; Kirschenbaum et al., 1999) and can be modified pharmacologically (Chen et al., 2000). Pathological events can also stimulate neurogenesis in the adult brain (Jin et al., 2004). These regional progenitors exhibit distinct profiles of cellular proliferation and differentiation in response to brain injury (Mehler and Gokhan, 1999). For example, chemoconvulsant-induced status epilepticus markedly increases dentate granule cell neurogenesis in the adult rat (Parent et al., 1997; Gray and Sundstrom, 1998). Ischemic cell damage in the hippocampus significantly increases cell proliferation and neurogenesis in the dentate subgranular zone, but not in the SVZ in the adult gerbil (Liu et al., 1998). Frontoparietal cortical lesion induces increased cell numbers in the SVZ of adult rats (Szele and Chesselet, 1996), and focal cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion leads to a marked increase of cell proliferation in the SVZ (Arvidsson et al., 2002).

It appears, therefore, that a variety of insults to the nervous system stimulates neurogenesis in some brain areas. To date, no such evidence has been demonstrated following lesion of the substantia nigra (SN). The aim of this work was to investigate whether lesion of the dopaminergic system, along with additional manipulations, such as grafting of dopaminergic cells and TMFS, induces or increases neurogenesis in the SVZ in correlation with improvement of the altered motor activity.

*Correspondence to: Dr. René Drucker-Colín, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-600, 04510 México D.F., México. E-mail: drucker@servidor.unam.mx

Received 29 March 2004; Revised 1 June 2004; Accepted 8 June 2004

Published online 9 August 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20235

MATERIALS AND METHODS

Subjects

In total, 128 adults male Wistar rats weighing 180–200 g were used in this study. These animals were divided into various groups depending on the experiments described below.

Nigrostriatal Lesion and Behavioral Tests

Animals were maintained in a 12-hr light:12-hr dark cycle (light on at 0700 hr) and kept at $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Food and water were provided ad libitum. Stereotaxic surgery was performed using anesthesia either with halothane (0.8% in a mixture of 95%/5% O_2/CO_2) or with ketamine-xylazine (87 and 13 mg/kg, respectively). Under aseptic conditions, the SN was unilaterally lesioned by injection of 4 μl 6-hydroxydopamine (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0.9% NaCl with 0.5% ascorbic acid) into the right medial forebrain bundle as described by Dunnett et al. (1981). Stereotaxic coordinates for lesion were 3.5 mm anterior to the interaural line; 1.5 mm lateral to the sagittal suture, and 8.8 mm below the skull surface. The incisor bars were placed 2.4 mm below the interaural line. The extent of nigrostriatal denervation was evaluated 15 and 30 days after surgery (pretest period), by counting the number of turns elicited by intraperitoneal (i.p.) injection of amphetamine (2.5 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO). Only animals with more than 500 complete turns in 90 min, ipsilateral to the lesioned side, were selected (Dunnett et al., 1981). Transplantation of chromaffin cells took place 1 week after the last pretest behavioral evaluation. The number of turns elicited by amphetamine 30 days after surgery was taken as baseline = 0. Thirty-two lesioned rats were divided into four groups: group 1, sham exposed to transcranial magnetic field stimulation (TMFS; $n = 8$); group 2, exposed to TMFS ($n = 8$); group 3, with chromaffin cell transplant ($n = 8$); group 4, with chromaffin cell transplant + TMFS ($n = 8$). Behavioral evaluations continued every 15 days until the experiment was discontinued, at 90 days after SN lesion. Data from these animals appear in Table I and refer to the last four groups mentioned as lesioned.

Intracerebral Transplant of Chromaffin Cells

Newborn 3–5-day-old rats (~100 pups) were killed by ice exposure. Chromaffin cells (CCs) were obtained as previously described (Drucker-Colín et al., 1994), which in short consisted of the following: Adrenal medulla tissue was placed in Ca^{2+} -free Spinner's saline solution (Sigma) supplemented with (1 mg/ml) bovine serum albumin (BSA; Sigma). Tissue fragments were enzymatically digested in Spinner's saline solution supplemented with 2 mg/ml collagenase (Worthington type I) and 1.5 mg/ml deoxyribonuclease type II (Sigma) for 45 min at 37°C . Freshly dissociated CCs were suspended in culture medium [Dulbecco's modified eagle medium (DMEM); Gibco, Grand Island, NY]; supplemented with 4.5 μg insulin (Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), 100 mg/ml streptomycin (Sigma), and 2.5 mg/ml fungizone (Gibco); and kept in a tissue culture incubator until the transplant. Host animals were anesthetized with either halothane or ketamine-xylazine and placed in the stereotaxic apparatus. A burr hole was drilled in the skull, and CCs were aspirated into a glass micropipette with a tip diameter of less than 100 μm attached to a 10- μl Hamilton syringe mounted in a

manually driven microinjector (KD Scientific). The stereotaxic coordinates for transplantation were 1 mm anterior to the interaural line; 2.2 mm lateral to the sagittal suture, and 5.5 mm below the skull surface, with the incisor bar set at 2 mm below the interaural line. Four microliters of DMEM, containing a suspension of 1×10^6 CCs, were injected at a flow rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ into the head of the caudate nucleus on the lesioned side of the brain. All rats were treated in accordance with procedures approved by UNAM's Committee of Bioethics and Care of Experimental Animals and the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1985). All efforts were made to prevent animal suffering and to minimize the number of animals used in the experiments.

TMFS Procedures

Animals were placed in plastic cylindrical cages designed to keep them immobile while they received magnetic stimulation to their heads. The stimulation consisted of an oscillatory magnetic field (60 Hz; 0.7 mTesla) applied for 2 hr in the morning and 2 hr in the afternoon. Animals showed no signs of discomfort when exposed to TMFS. The daily time of exposure to TMFS was selected on the basis of our previous reports demonstrating *in vitro* neuronal differentiation of CCs (Drucker-Colín et al., 1994; Feria-Velasco et al., 1998). The length of *in vivo* exposure was determined on the basis of preliminary experiments indicating 60 days of TMFS as optimal (Verdugo-Díaz and Drucker-Colín, unpublished observations). In 5-bromo-2-deoxyuridine-5-monophosphate (BrdU)-labeling experiments, rats were exposed for 1 week only to TMFS. A pair of 7-cm-diameter Helmholtz coils (selected to minimize electric field effects) generated the fields. The 2-hr exposure to TMFS induced a maximum of 0.5–1 $^{\circ}\text{C}$ temperature increase in the chamber. The two coils were located dorsally and ventrally to the head. The distance between each coil and the midpoint of the head was approximately 6 cm. TMFS was initiated on the next day after the transplant. Sham-exposed animals were placed into similar plastic cages with the coils turned off, at a distance of at least 1.5 m from the group receiving TMFS.

Tyrosine Hydroxylase Immunohistochemistry and Immunofluorescence

At the end of behavioral tests (60 days, preceded by 30 days of evaluation after SN lesion), 32 animals (eight from each experimental group; the same animals are described under Nigrostriatal lesion and behavioral tests) were deeply anesthetized with Nembutal (100 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with saline, followed by ice-cold 4% paraformaldehyde. Brains were then removed, placed in buffered 4% paraformaldehyde for 24 hr and 15% sucrose for 24 hr, and finally cut into 30- μm slices. After being blocked with horse serum, slices were incubated overnight at 4°C in the presence of a rabbit primary antibody antityrosine hydroxylase (Chemicon, Temecula, CA; 1:2,000 dilution) in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 hr and then incubated with biotinylated secondary anti-rabbit antibody (Vector, Burlingame, CA; 1:1,000 dilution) for 2 hr at room temperature. Subsequently, slices were washed in PBS and incubated with avidin-biotin-horseradish peroxidase complex. Diaminobenzidine was then used as a chromogen for light

microscopy (Hsu et al., 1981). For tyrosine hydroxylase (TH) immunofluorescence, sections were incubated for 24 hr in the presence of a rabbit anti-TH antibody at 1:200 dilution (Chemicon) and then incubated for 2 hr at room temperature in the presence of a tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated anti-rabbit IgG (Vector) at 1:500 dilution. Sections used as negative controls were treated identically, except that the primary antibody was omitted.

Brains of control animals (unlesioned rats) were analyzed with TH immunohistochemistry. Forty additional animals were divided into the following groups: control animals ($n = 8$), control + sham exposure to TMFS ($n = 8$), control + exposure to TMFS ($n = 8$), control + transplant of CCs ($n = 8$), and control + transplant of CCs exposed to TMFS ($n = 8$). Data from these animals appear in Table I and refer only to the first five groups mentioned as controls.

Fluorescent Labeling of CCs With Fluoro-Gold

CCs were cultured as described (Drucker-Colín et al., 1994) and labeled by incubation for 2 days with 1% Fluoro-Gold (FG; Molecular Probes, Eugene, OR; H-7599). Cells were washed twice with fresh DMEM, detached mechanically, and transplanted into the brain of a new set of eight lesioned animals specifically used for this experiment: group FG_A, animals with sham exposure to TMFS ($n = 4$); group FG_B, rats with TMFS ($n = 4$). Two months after transplantation and TMFS, animals were deeply anesthetized with Nembutal and perfused transcardially with ice-cold buffered 4% paraformaldehyde. Brains were removed and placed in the buffered paraformaldehyde fixative for 24 hr with 15% sucrose for 24 hr. Tissues were cut into 30- μ m slices and processed for TH immunofluorescence.

Construction of the Replication-Defective Adenoviral Vector (AdGFP) and Gene Delivery

Methods for the construction of replication-defective Ad vectors have been described elsewhere (He et al., 1998). These Ad vectors are E1-a, partially E1-b, and partially E3-deleted vectors based on human adenovirus type 5. Briefly, a shuttle plasmid containing the green fluorescent protein (GFP) reporter gene under the transcriptional control of pCMV (pAd-Track) was used for the construction of the AdGFP vector. Homologous recombination with the AdEasy 1 plasmid was carried out in electrocompetent bacteria. Clones that had inserts were tested by restriction endonuclease digestion. With confirmation, supercoiled plasmid DNA was amplified in DH10B bacteria. Subsequently, 293 cells were transfected with the digested recombinant plasmid Pac1. Infected cells were monitored for cytopathic effect, collected, and lysed with three cycles of freezing and thawing, and purified by cesium chloride gradients. The stock titer was 5×10^8 pfu/ml. In vitro transfection of CCs with GFP was performed by plating 1×10^7 cells in 25-cm² Petri dishes. Twenty-four hours after plating, cells were incubated for 2 hr with AdGFP at a multiplicity of infection (moi) of 5 in 50 μ l serum free-OptiMEM medium. After 2 hr, the CCs were collected, centrifuged at 1,000 rpm for 3 min, and resuspended in 1 ml fresh DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion. After infection, cells were washed twice with supplemented DMEM, detached mechanically, and transplanted into

the brains a new set of 16 lesioned animals used specifically for this experiment: group GFP_A, animals with sham exposure to TMFS ($n = 8$); group GFP_B, rats with TMFS ($n = 8$). Fourteen days after transplantation and TMFS, animals were deeply anesthetized with Nembutal and perfused transcardially with saline, followed by ice-cold paraformaldehyde (4%). Brains were then removed, placed in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde for 24 hr and 15% sucrose for 24 hr, and finally cut into 30- μ m slices to be processed for TH immunofluorescence.

In Vivo BrdU Labeling

To determine whether ependymal and subependymal cells proliferate after these treatments, an antibody against the thymidine analogue BrdU was used to identify potential neural stem cells. An additional and independent group of 32 SN-lesioned rats was divided into four groups: group BrdU_A, SN lesioned, sham exposed to TMFS ($n = 8$); group BrdU_B, SN lesioned + TMFS ($n = 8$); group BrdU_C, SN lesioned + CCs transplant ($n = 8$); group BrdU_D, SN lesioned + CCs transplant + TMFS ($n = 8$). The extent of nigrostriatal denervation was evaluated 15 and 30 days after SN lesion. One week after the last behavioral evaluation, groups 3 and 4 were transplanted, and TMFS was initiated in groups 2 and 4. Thereafter, all groups were treated with BrdU, administered twice daily during 7 days (50 mg/kg i.p., dissolved in 0.9% NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). On the next day after the last injection, animals were deeply anesthetized (Nembutal 100 mg/kg, i.p.), and their brains were processed for BrdU immunofluorescence as explained below.

BrdU, TH, and NeuN Immunofluorescence

After transcardiac perfusion with ice-cold phosphate-buffered 4% paraformaldehyde, brains were postfixed in the same fixative and processed for paraffin embedding. Coronal sections, 10 μ m in thickness, were obtained through the striatum and lateral ventricles. After deparaffinizing, sections were placed in 1 N hydrochloric acid at 37°C for 30 min, washed with PBS, and incubated with blocking solution (horse serum 1.5%) for 30 min at 4°C and then for 36 hr at 4°C with the monoclonal antibody against BrdU in PBS (mouse anti-BrdU Kit II; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN; dilution 1:50). Subsequently, sections were incubated for 2 hr at room temperature with the fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary anti-mouse antibody (provided with the anti-BrdU Kit II; Roche Molecular Biochemicals). To determine whether ependymal and subependymal cells differentiate after treatments, cell-type-specific antibodies were used. Sections were incubated for 2 hr at room temperature with primary antibodies against TH (rabbit anti-TH; Chemicon; 1:1,000 dilution) or the neuronal nuclear antigen (mouse monoclonal anti-NeuN; Chemicon; 1:500 dilution). The secondary antibody to visualize either NeuN or TH was a TRITC-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibody, respectively (Zymed, South San Francisco, CA; 1:250 dilution). Incubation in secondary antibodies was carried out in blocking solution (BSA 1%) for 2 hr at room temperature. Sections for negative control were treated identically, except that primary antibodies were omitted. Brain sections were mounted with fluorescence mounting me-

dium (Dako, Carpinteria, CA). The criteria to identify BrdU-positive cells were defined such that BrdU staining should be localized within intact, round or oval nuclei.

Digital Fluorescence and Confocal Microscopy

A Nikon Diaphot microscope equipped with an epifluorescence device was used for imaging. For FG, a filter set with 380-nm excitation filter and 510-nm emission filter was used. For TH immunofluorescence, a standard rhodamine Nikon filter set (510–560-nm excitation and 590-nm emission) was used. Brain slices were examined with oil-immersion fluorescence objectives ($\times 10$, 0.45 NA; Leitz, Wetzlar, Germany; and $\times 60$, 1.4 NA, Plan Apo, Nikon, Japan), first with phase-contrast microscopy and then with epifluorescence for FG and TH, respectively. Corresponding digital images were acquired alternatively with a cooled CCD digital camera (SenSys 0401E; Roper Scientific, Tucson, AZ). Illumination was limited with an electronic shutter (Lambda 10; Sutter Instruments). Exposures were for between 0.6 and 1.0 sec. Images were stored in a TIFF image format (both 8- and 16-bit resolution) and analyzed with Metamorph 4.0 (Universal Imaging Corp., West Chester, PA).

Confocal images of brain slices were obtained with an MCR 1024 Bio-Rad laser scanning system equipped with an Ar Kr/Ar laser attached to an inverted Nikon TMD 300 microscope. Images were collected with oil-immersion objectives ($\times 10$, 0.45 NA; Leitz; and $\times 60$, 1.4 NA, Plan Apo; Nikon). For imaging of GFP of FITC immunofluorescence (BrdU), samples were excited at 488 nm and emitted light was bandpassed with a 522-/DF32-nm filter. For imaging of TRITC immunofluorescence (TH, NeuN), samples were excited at 568 nm, and emitted light was bandpassed at 605/DF32 nm. Images at 488-nm and 568-nm excitation were obtained by two separate photomultiplier channels, either concurrently or in separate runs. Analysis and processing of confocal images were carried out with software written by Todd Clark Breile (Confocal Assistant 4.02). Final image composition was made with Paint Shop Pro 5.0 (Jasc Software Inc) and Microsoft Power Point.

Statistical Analysis

Each pair of animal groups or pair of characteristics was analyzed with a one-tail analysis of variance (ANOVA). Significant differences between the averages were determined by using Student's *t*-test and Neuman-Keuls test, with $P < 0.05$ values considered as statistically significant.

RESULTS

Behavioral Tests

As shown in Figure 1, after the establishment of the amphetamine-induced rotational behavior, SN-lesioned animals showed a progressive worsening of turning behavior. The number of turns elicited by amphetamine after 2 months increased by 24.4% with respect to pretest baseline ($P = 0.008$). Interestingly, this worsening of motor asymmetry was almost completely prevented by exposure to TMFS. In fact, 2 months after TMFS treatment, animals showed a small reduction (0.7%) in the number of turns elicited by amphetamine with respect to their own controls. SN-lesioned animals exposed to

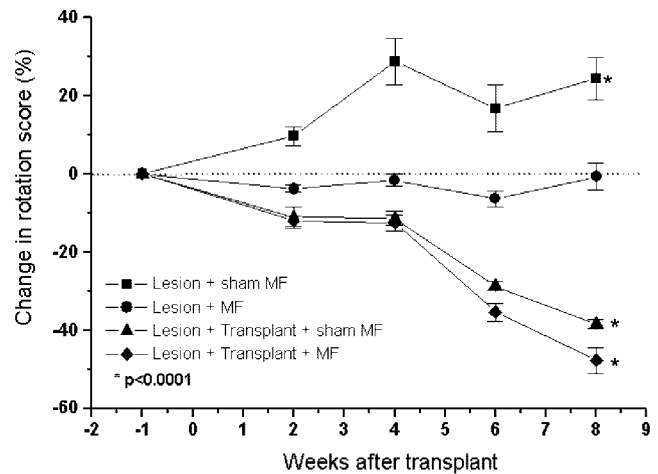


Fig. 1. Normalized percentage changes of the number of amphetamine-induced rotations in rats with nigrostriatal lesion after different experimental manipulations. The data point at week -1 represents the mean of four tests conducted 1 week before the beginning of the observation period (pretest score), and the point at 0 represents the beginning of the experimental manipulations. The ordinate indicates the percentage decrease (-) or increase (+) in the number of turns with respect to the pre-test score, i.e., improvement or deterioration of motor asymmetry. In the sham-exposed group (■), the number of turns increased progressively, reflecting a time-dependent worsening of the motor deficit; this deterioration of the turning behavior was prevented by transcranial magnetic field stimulation (TMFS; ●). A more substantial improvement was observed in animals receiving grafts of chromaffin cells (▲). The small improvement exhibited by animals receiving TMFS in addition to transplant (◆) is not statistically significant. * P values: comparison respect to pre-test score; $n = 8$ for all groups.

TMFS turned 25.1% less often than SN-lesioned animals receiving no TMFS ($P < 0.0001$). Animals receiving transplants of CCs exhibited a more substantial improvement of their motor asymmetry compared with their own pretransplant controls (38.4% fewer turns; $P < 0.0001$) or with control animals receiving neither transplant nor TMFS (62.8% fewer turns; $P < 0.0001$). A small additional improvement of motor asymmetry exhibited by animals receiving TMFS in addition to transplant (9.3% less turns) was not statistically different from that of animals receiving transplant alone ($P = 0.76$).

TH Immunoreactivity of Brain Sections

Our finding that exposure to TMFS reduce amphetamine-induced rotational behavior is reminiscent of studies in which symptomatic relief follows transplantation of fetal dopaminergic neurons (Brundin et al., 1988) or embryonic stem cells that differentiated into functional dopaminergic neurons (Björklund et al., 2002). This raised the question of whether magnetic stimulation could somehow restore dopaminergic function in the denervated striatum. As a first approximation, immunohistochemistry for TH was performed in brain sections of control and treated animals. Interestingly, for animals subjected to SN lesion, CCs grafting, and TMFS, we noticed the presence

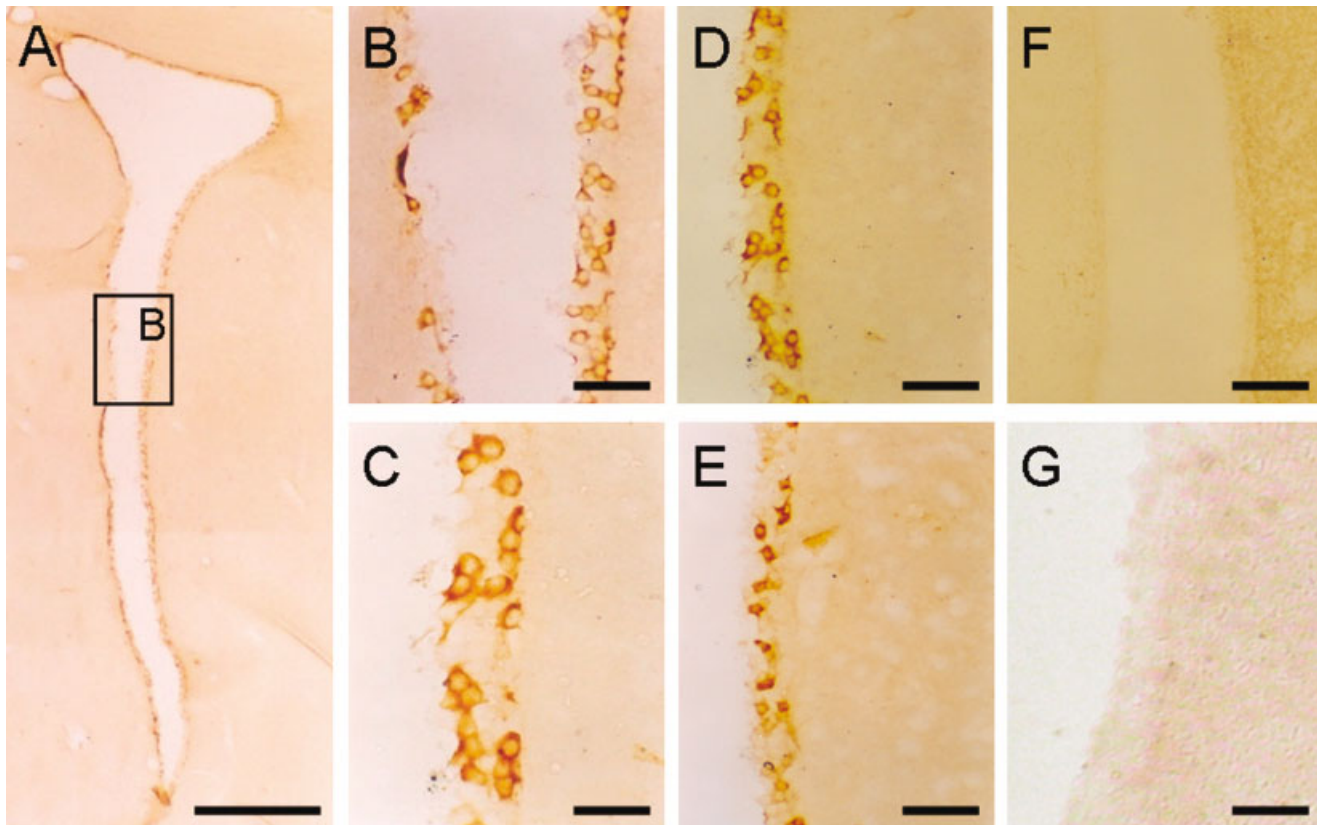


Fig. 2. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the lateral ventricle of the rat brain. **A:** Low-magnification micrograph comprising the right lateral ventricle of a rat with SN lesion that received transplant of chromaffin cells and exposure to TMFS. Numerous TH-immunoreactive cells can be seen lining the lateral ventricle. **B:** Higher magnification micrograph of the area delimited by the square in A. Several layers of TH-immunoreactive cells, some of them with distinct neuron-like morphology, can be seen in the ependymal and subependymal regions. **C:** Higher magnification of TH-immunoreactive

cells in the lateral ventricle of a rat with SN lesion plus transplant of CCs. **D:** Ependyma of the right lateral ventricle of a rat with SN lesion and TMFS. **E:** Lateral ventricle of a rat with SN lesion only. **F:** TH immunohistochemistry of the lateral ventricle of a control, untreated rat. **G:** Lateral ventricle micrograph from a rat with nigrostriatal lesion that received transplant of CCs and exposure to TMFS. TH immunohistochemistry was performed with the primary antibody omitted. Scale bars = 400 μm in A, 100 μm in B, D–F, 50 μm in C, G.

of numerous TH-immunoreactive cells in the ependyma and subependyma (also known as the SVZ) of both lateral ventricles (Fig. 2A,B). TH-immunoreactive cells were also present in the SVZ of SN-lesioned animals with CCs transplant alone (Fig. 2C), SN-lesioned animals exposed to TMFS alone (Fig. 2D), and animals with SN lesion only (Fig. 2E). TH⁺ cells were completely absent in the lateral ventricles of intact animals (Fig. 2F) or intact animals sham exposed to TMFS (data not shown). The morphology of the majority of these newly formed TH⁺ cells suggests a neuronal phenotype. Grafted CCs, clearly identified by their TH immunoreactivity, were confined for the most part within the right caudate nucleus, although a few dispersed cells were also found in the accumbens and the lateral septal nuclei (see Figs. 3, 4). No staining was observed when the TH immunohistochemistry procedure was carried out in brain sections of a rat with SN lesion that received transplant of CCs and exposure to TMFS, but with the primary antibody omitted (Fig. 2G).

The number of TH⁺ cells present in representative sections of the SVZ of both lateral ventricles of animals from the different experimental groups was counted, and data are summarized in Table I. Although either lesion of the SN pathway or TMFS alone was capable of inducing the appearance of TH⁺ cells in the SVZ, these cells were considerably more numerous in animals receiving transplant of CCs. TMFS increased the number of TH⁺ cells under all conditions, except for the groups of intact and lesioned animals. No statistically significant differences were found in the number of TH⁺ cells when data from the right and left SVZ were compared (Table I). This is noteworthy in that, in transplanted animals, CCs were placed in the right striatum. The appearance of equal numbers of TH⁺ cells in both lateral ventricles of transplanted animals suggests that TH⁺ cells observed in the SVZ do not correspond to CCs that migrated from the graft, given the substantial difference in length of the putative migration pathways to the lateral ventricles.

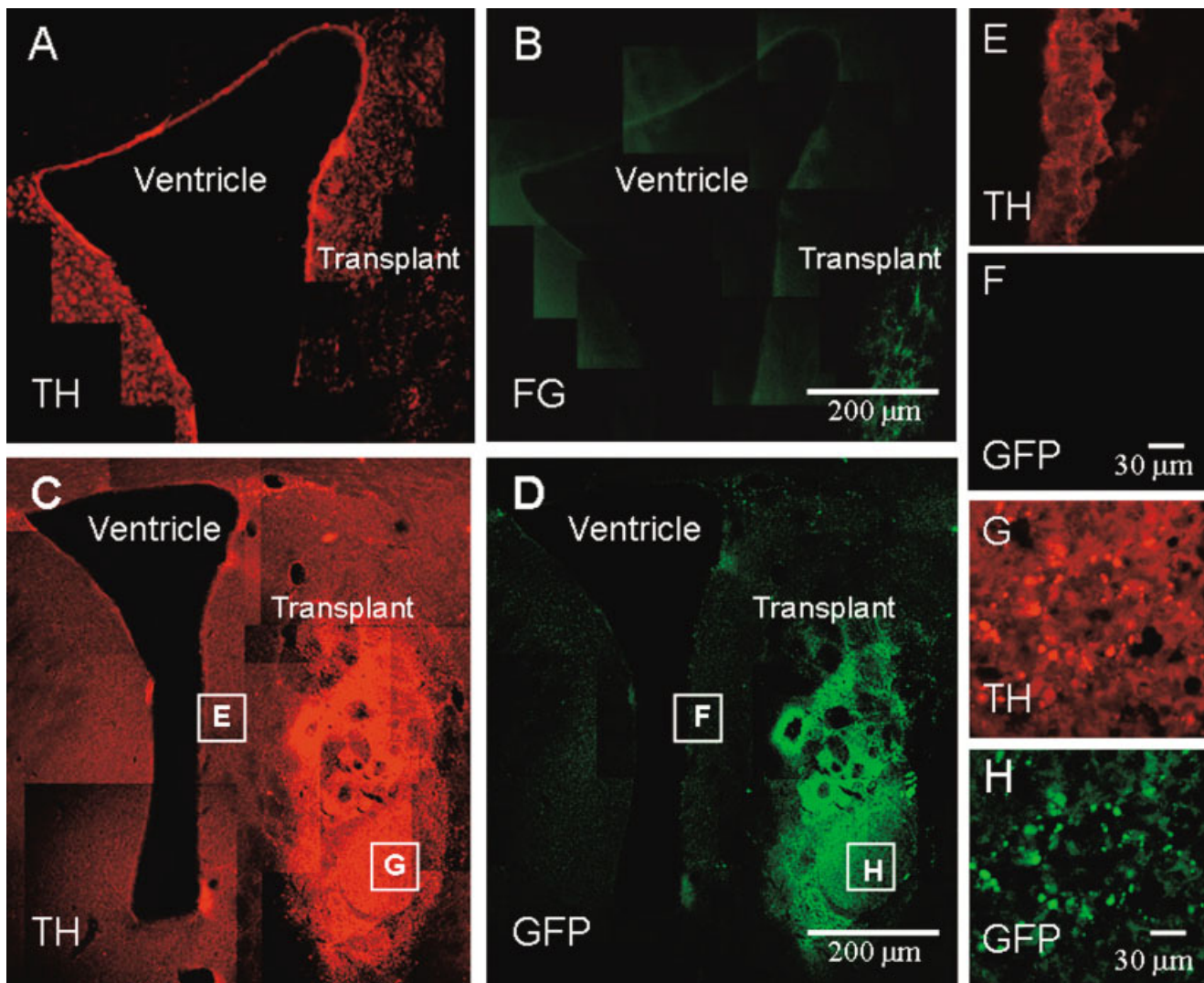


Fig. 3. Distribution of grafted chromaffin cells prelabeled with fluorescent markers. **A,B:** Low-magnification composite digital fluorescence micrographs of the same coronal brain section from a rat with SN lesion, 1 week after the transplant of CCs transfected with fluoro-gold (FG) and exposure to TMFS. **A:** Tyrosine hydroxylase (TH) immunofluorescence. **B:** Fluoro-gold fluorescence. TH-immunoreactive cells were present both in the graft area and in the ependyma and subependyma of the ipsilateral ventricle (**A**), but FG-labeled cells remain confined to the transplant (**B**). **C,D:** Low-magnification composite confocal micrographs of the same coronal brain section. **C:** TH im-

munofluorescence. **D:** Green fluorescent protein (GFP) fluorescence. Rat with SN lesion 1 week after grafting of CCs expressing GFP and exposure to TMFS. As expected, grafted CCs are positive both for TH and GFP (compare Fig. 3C and D). This can be distinguished more clearly in the high-magnification micrographs obtained from the corresponding boxed areas, G and H. **E:** TH immunoreactivity in the SVZ of the lateral ventricle. **F:** GFP fluorescence from the same field. TH-positive cells in the SVZ consistently lacked GFP fluorescence. **G:** TH immunoreactivity in a group of grafted CCs. **H:** GFP fluorescence in the same group of cells.

Intracerebral Transplant of Labeled CCs

To rule out the possibility of transplanted CC migration into the SVZ, a study was made of the distribution pattern of CCs pre-labeled with the fluorescent tracer FG. Two months after their transplantation into the striatum, labeled CCs could be clearly seen under fluorescence microscopy. The majority of grafted cells appeared as clusters around the injection site, expressing TH immunoreactivity (Fig. 3A,B). FG-labeled cells were never seen

in the vicinity of lateral ventricles of SN-lesioned rats either with or without exposure to TMFS (Fig. 3B). It has been reported that FG prelabeling may compromise cell viability (Garret et al., 1991), and leakage of FG can lead to labeling of resident non-CCs near the graft (Wessendorf, 1991), so additional experiments were conducted using a different labeling procedure, based on the expression of GFP cloned from *Aequorea victoria* and widely used as a reporter for gene transfection and as a tumor cell marker

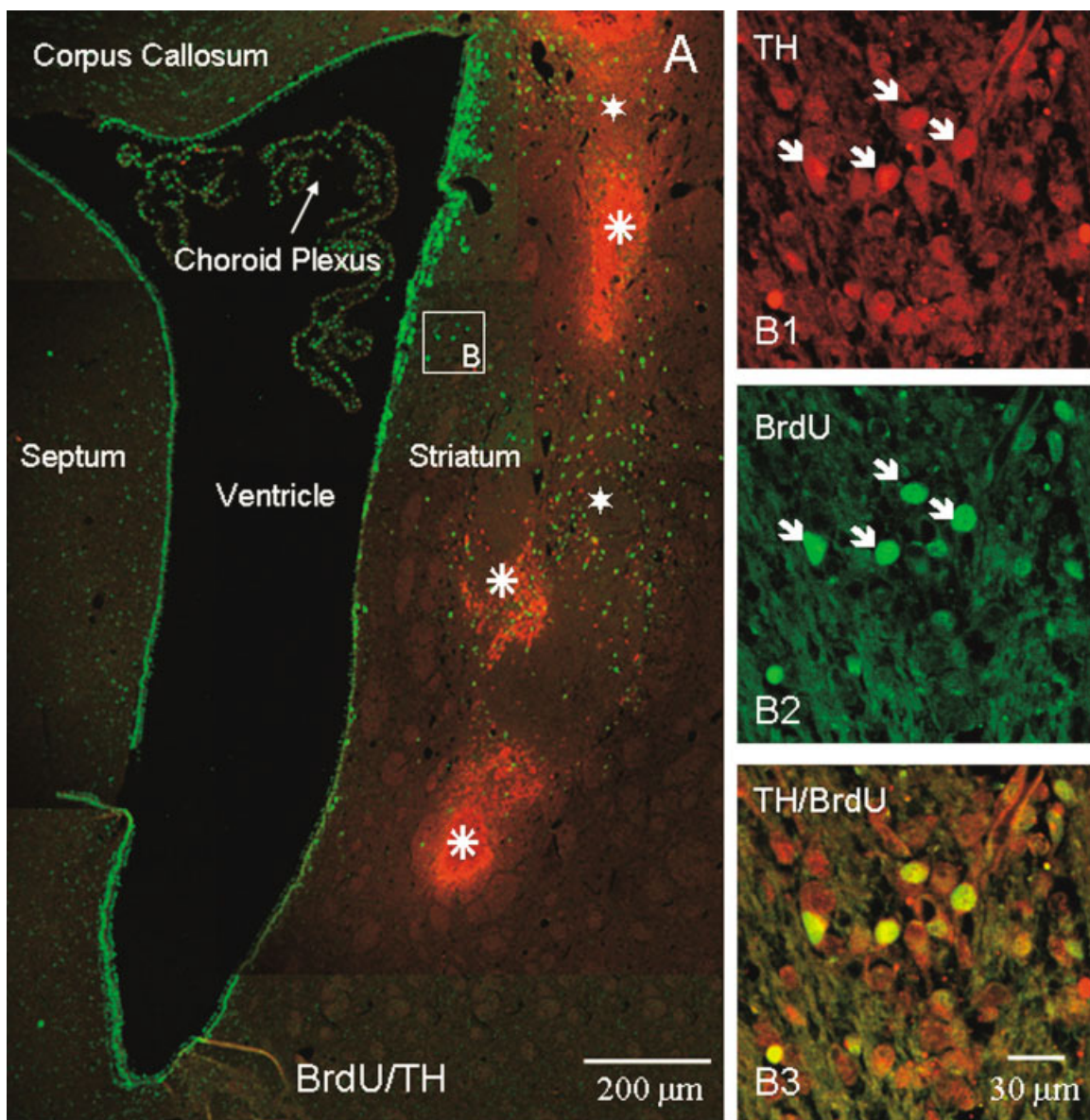


Fig. 4. Increased cell proliferation in the adult ependyma and subependyma (subventricular zone, SVZ). Cells immunoreactive to TH are newly formed. **A:** Low-magnification composite confocal micrograph of the right lateral ventricle of a rat brain with SN lesion, showing the distribution of TH and BrdU immunofluorescence (red and green, respectively), 1 week after grafting of CCs and TMFS. BrdU-labeled nuclei can also be seen in ependyma, subependyma, choroid plexus, and striatum. BrdU-labeled nuclei in the graft area (stars) suggest cell proliferation associated to the inflammatory response. Large clusters of

TH positive CCs can be seen throughout the graft zone (asterisks). **B1–B3:** High-magnification micrographs of the area in the striatum near the lateral ventricle indicated in A. B1: TH immunofluorescence. B2: BrdU immunofluorescence. B3: Merged image of micrographs B1 and B2. Some of the TH⁺ cells identified in this area (which might represent cells originating in the SVZ migrating into the striatum) were born during the last week of the experiment, as indicated by their BrdU-labeled nuclei (arrows).

for *in vivo* studies (Wahlfors et al., 2001). The majority of GFP-labeled cells were also TH⁺, indicating that they correspond to grafted CCs (compare Fig. 3G and H). In agreement with FG-labeling experiments, no GFP-positive cells were seen in the ependyma or subependyma, or even in the vicinity of the lateral ventricles (Fig. 3D,F), whereas numerous TH⁺ cells were

seen bilaterally in the SVZ of animals receiving transplant, with or without TMFS (Fig. 3C,E). Together, these findings strongly support the notion that TH⁺ cells that appear in the SVZ do not correspond to CCs that migrated from the graft. Consequently, these cells are more likely to have originated from progenitor cells resident in the SVZ, which were induced to acquire a

TABLE I. Tyrosine Hydroxylase-Positive Cells Counted in 500- μ m Vertical Extension of the Subventricular Zone at the Level of the Striatum of all Groups of Rats After the Different Procedures Employed[†]

Experimental groups	Lateral ventricle from the lesioned/implanted side of the brain	Lateral ventricle from the contralateral side of the brain
Control	None	None
Control + Sham TMFS	None	None
Control + TMFS	85.0 \pm 6.9	66.9 \pm 4.9
Control + Tx	114.1 \pm 8.7	117.3 \pm 7.3
Control + Tx + TMFS	185.2 \pm 14.2	165.3 \pm 8.0
Lesion + sham TMFS	105.7 \pm 7.5	112.4 \pm 6.9
Lesion + TMFS	142.7 \pm 8.5	136.4 \pm 9.1
Lesion + Tx	241.3 \pm 15.1**	238.0 \pm 12.6**
Lesion + Tx + TMFS	289.3 \pm 19.5*	268.2 \pm 17.0*

[†]Data are mean \pm SD Tx, chromaffin cell transplant; TMFS, transcranial magnetic field stimulation.

* $P < 0.01$ statistically different from all groups, except vs. lesion + Tx group.

** $P < 0.05$ $n = 8$ for all groups.

TH⁺ phenotype as a result of the experimental manipulations (see below).

Incorporation of BrdU and TH Immunoreactivity

To investigate whether precursors of the adult fore-brain subependymal region were competent to respond to the instructions elicited by unilateral SN lesion, CC transplant, and/or exposure to TMFS, animals were injected daily during the last week with BrdU, a marker for newly formed DNA. Then, brain sections were examined for nuclear incorporation with an antibody raised against BrdU. To test the hypothesis that TH⁺ cells in the SVZ result from increased proliferation and differentiation induced by the different treatments, the same brain sections were reacted with antibodies directed against TH.

In control rats, few cells immunoreactive for BrdU were found in the subependymal zone and in the choroid plexus (data not shown). In contrast, when the lateral ventricles were examined 1 week after transplant of CCs and exposure to TMFS, a bilaterally symmetrical increased BrdU labeling was observed across the entire ependyma and the subependyma, as well as in the choroid plexus (Figs. 4A, 5A–E). Many BrdU-labeled cell nuclei were observed in the dorsal-lateral corner of both lateral ventricles between the corpus callosum and the striatum (Figs. 4A, 5A,C), which corresponds to the rostral extension of the SVZ, i.e., the migratory stream to the olfactory bulb (Peretto et al., 1999). Scattered BrdU-labeled nuclei were also seen in the striatum (Figs. 4A,B1–3, 5D,E) and in the corpus callosum (Figs. 4A, 5B). This indicates that large numbers of cells in the lateral ventricle have progressed through S phase of the cell cycle during the period of BrdU availability. The BrdU-labeled nuclei in the graft area (Fig. 4A, stars) are likely to result from cell proliferation associated with the inflammatory response.

Most cells immunoreactive both to TH and to BrdU were observed in the ependyma and the subependyma (Figs. 4A, 5B–E). A few scattered doubly labeled cells were also found in the striatum adjacent to the ventricle

wall (Fig. 4, arrows). It is tempting to speculate that these cells originated in the SVZ and migrated into the denervated striatum nearby. Nevertheless, not all TH⁺ cells in the striatum had BrdU-labeled nuclei (Fig. 4B1–3). BrdU-positive cells within the graft area did not express TH (data not shown).

Together, these results confirm the notion that the appearance of TH⁺ cells in the ventricle ependyma and subependyma of the lateral ventricle results from increased proliferation and differentiation in response to signals originating from the denervated striatum and/or from the grafted CCs. TMFS may have additional effects on proliferation. It remains to be determined whether these effects are direct or indirect.

The distribution of TH immunoreactivity found in these experiments is consistent with that described earlier: Numerous TH⁺ cells were found in the ependyma and subependyma of the lateral ventricles. TH immunoreactivity shown in Figures 4 and 5 appears to be less intense compared with that shown in Figure 2. However, one must consider that, in the latter experiments, the progression after CC grafting and/or TMFS lasted for only 1 week. Stronger and more distinct TH staining can be observed after 2 months (manuscript in preparation). The majority of cells immunoreactive to TH had BrdU-positive nuclei, indicating that they were of recent formation.

BrdU Labeling and TH Immunoreactivity

To characterize further the phenotype of cells labeled by BrdU after the different treatments, we performed double-labeling experiments with antibodies raised against BrdU and against NeuN, a neuron-specific, developmentally regulated nuclear protein associated with withdrawal from the cell cycle and terminal differentiation (Mullen et al., 1992). For the most part, BrdU and NeuN doubly positive cells were seen in distinct non-overlapping cell populations, indicating that BrdU is not incorporated into mature neurons. Few doubly labeled BrdU/NeuN

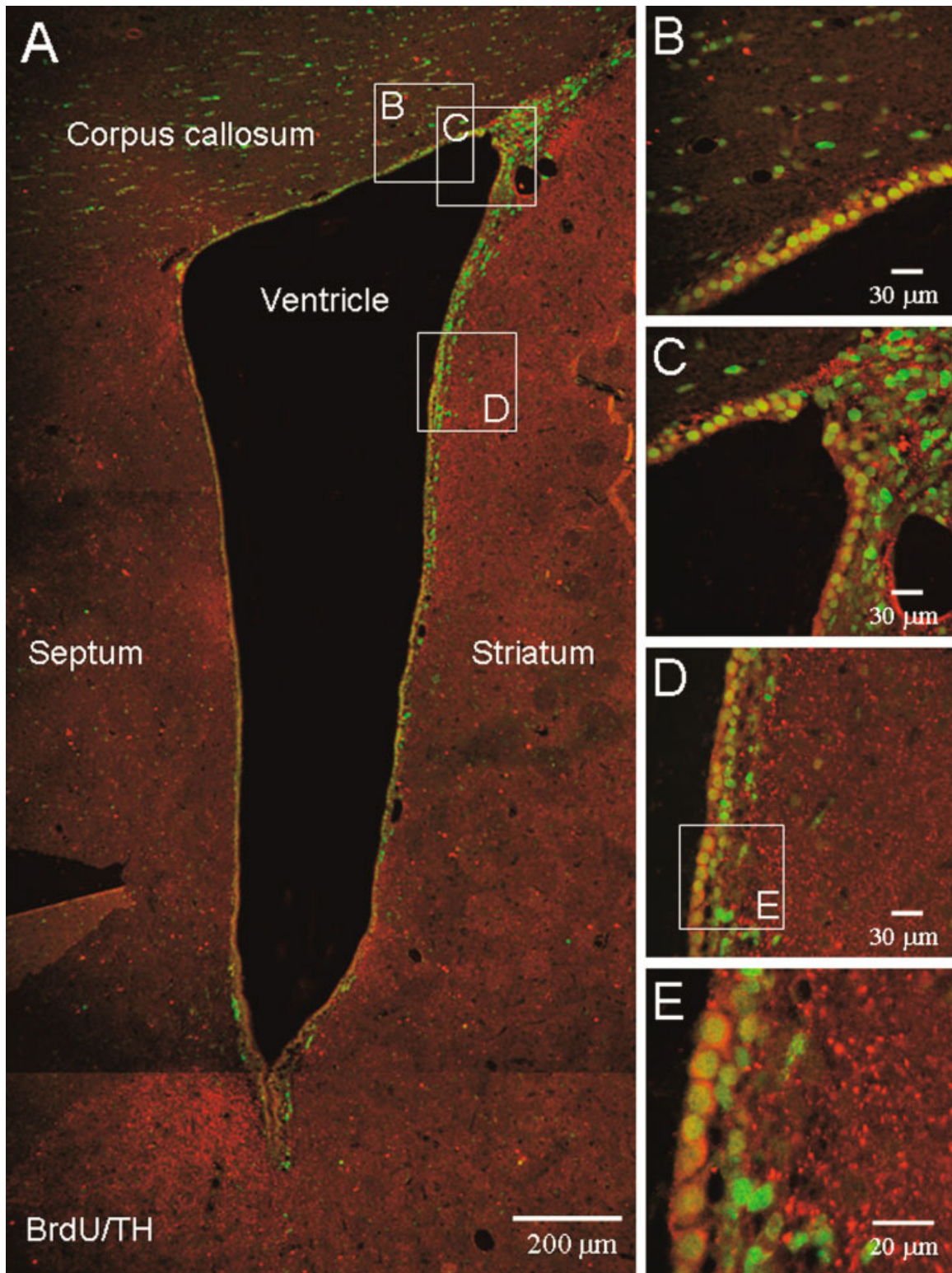


Fig. 5. Distribution of TH and BrdU immunoreactivity. **A–D**: Confocal micrographs of a coronal brain section showing TH and BrdU immunoreactivity (red and green, respectively). This example corresponds to a rat with SN lesion, 1 week after grafting of chromaffin cells and exposure to TMFS. **A**: Composite low-magnification micrograph of the entire right lateral ventricle. BrdU immunoreactivity can be seen predominantly in ependyma and subependyma (SVZ), although some positive nuclei are also present in striatum and corpus callosum. **B–D**: High-magnification micrographs of the corresponding areas delimited by squares in **A**. **B**: Most

ependymal cells lining the callosum are doubly stained. Scattered cells in the callosum have BrdU-positive nuclei but lack TH immunoreactivity. **C**: BrdU-labeled cells in the ependyma and dorsal-lateral corner of the lateral ventricle, which corresponds to the rostral extension of the migratory stream to the olfactory bulb. Many ependymal cells are doubly immunoreactive to BrdU and TH, but most cells in the rostral stream are positive to BrdU only. **D**: Most cells TH⁺ cells in the ependyma have BrdU-labeled nuclei, as shown at higher magnification in **E**. Scattered BrdU-positive cells in the subependyma and striatum are also TH⁺.

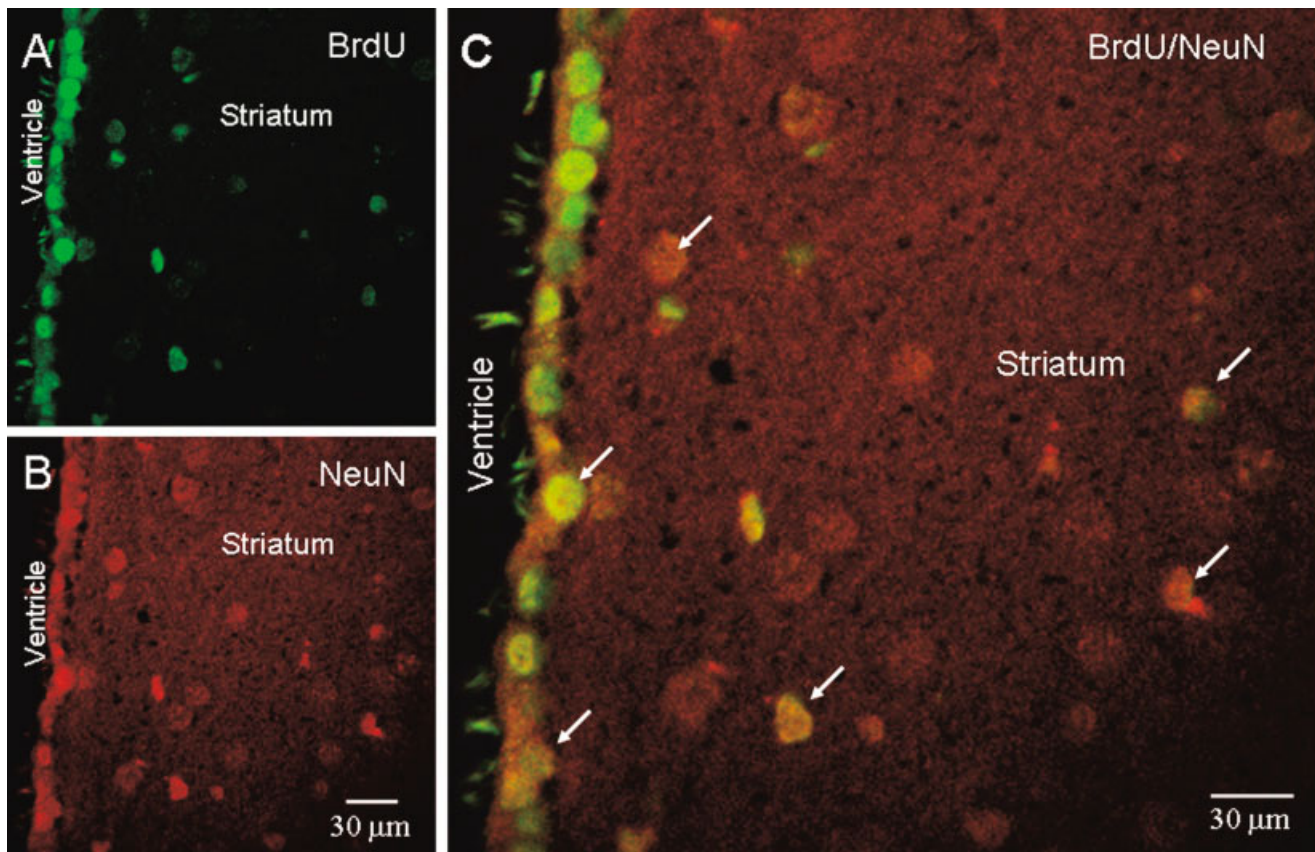


Fig. 6. Confocal micrographs showing BrdU and NeuN immunoreactivity in the right lateral ventricle of a rat with nigrostriatal lesion, 1 week after grafting of chromaffin cells and exposure to TMFS. **A,B:** High-magnification micrographs of a brain section from the lateral ventricle. A: BrdU immunostaining. B: NeuN immunoreactivity.

BrdU-positive nuclei are predominant in the ependyma, but they are also found in the subependyma and striatum nearby. Some newly formed cells also express the neuronal marker NeuN. **C:** Merged image of micrographs shown in A and B (red NeuN, green BrdU). Doubly labeled cells appear yellow. Some of them are indicated with arrows.

nuclei were localized in the choroid plexus or in the ependyma and subependyma of the SVZ (Fig. 6). Scattered doubly labeled cell nuclei were also seen in the striatum near the SVZ (Fig. 6, arrows). Again, one can conjecture that these cells could have originated in the SVZ and migrated into the striatum. Some of these NeuN⁺ cells were also TH⁺ (data not shown), suggesting that at least some of these cells are indeed newborn neurons.

DISCUSSION

Behavioral and Histological Findings

As this study shows, the extent of motor asymmetry revealed by amphetamine injection increased progressively in animals with SN lesion receiving no further treatments. This deterioration is prevented by TMFS, and further improvement occurs after grafting of CCs. Conceivably, the improvement in motor behavior occurred because amphetamine caused sufficient dopamine release from newly formed TH-expressing cells and/or transplanted CCs. This hypothesis requires further investigation.

An interesting observation in the present study is the appearance of neuron-like TH⁺ cells in the ependyma and subependyma of the lateral ventricles in rats with SN lesion. TMFS alone stimulated slightly the TH⁺ phenotype, but grafting of CCs in conjunction with TMFS showed the greatest efficacy (Table I). Our initial explanation, i.e., that TH⁺ cells appearing in the SVZ were merely CCs migrating from the graft, was ruled out, insofar as labeled CCs did not extend much beyond the graft (Fig. 3). Thus, the questions remaining are: what is the origin of TH⁺ cells in the SVZ, and which signals mediate cell proliferation and differentiation? Neurogenesis and TH expression in the SVZ can be induced to different degrees by: 1) unilateral lesion of the nigrostriatal pathway, 2) transplant of CCs into the striatum, and 3) TMFS. The possible mechanisms involved in each case not only might differ but are presently unknown.

Neurogenesis in the SVZ of Adult Brain

It is known that neurogenesis continues in the SVZ of the adult brain, giving rise to new interneurons that

reach the olfactory bulb (Peretto et al., 1999; Gage, 2002). Furthermore, marked cell proliferation occurs in the SVZ after prolonged seizures (Parent et al., 2002a) or local ischemia (Arvidsson et al., 2002; Parent et al., 2002b; Li et al., 2002). Other stimuli can also promote SVZ proliferation (see below). These findings indicate that the progenitor cell population of the SVZ can be expanded both by physiological stimuli and in pathophysiological conditions.

Some of the microenvironmental cues that direct neurogenesis of progenitor stem cells in the adult SVZ have been identified (Alvarez-Buylla and García-Verdugo 2002). Intraventricular administration of epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and erythropoietin and infusion of transforming growth factor (TGF α) into the striatum of adult rats dramatically increase the number of newborn cells in the SVZ (Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Zigova et al., 1998; Fallon et al., 2000; Pencea et al., 2001; Shingo et al., 2001). Noggin, which is produced by ependymal cells, also promotes neurogenesis (Lim et al., 2000). Pathological conditions could induce the same environmental clues to direct SVZ proliferation and differentiation. Recent data indicate that ischemic insults stimulate neurogenesis in the SVZ in vivo through the release of stem cell factor and FGF-2 (Jin et al., 2002). The cytokine erythropoietin has also been implicated (Shingo et al., 2001).

Neurogenesis in the SVZ Following Lesion of the Nigrostriatal Pathway and CC Grafting

To our knowledge, the induction of neurogenesis in the SVZ following SN lesions or grafts of CCs has not been reported (Fallon et al., 2000). Destruction of the SN and the ensuing dopaminergic denervation of the striatum can induce trophic signals, similar to those released after ischemia, leading to increased neurogenesis (Zhou et al., 1996). Similarly, augmented proliferation and differentiation in the SVZ subsequent to grafts of CCs could result from 1) production of local trophic signals by the injury of grafting itself and 2) local release of neurotrophic molecules known to be present in CC granules (Kriegstein and Unsicker, 1997). Admittedly, the effect of these factors should be more noticeable ipsilateral to the denervation site/graft (Fallon et al., 2000). However, similar neurogenesis took place in the SVZ of both lateral ventricles, suggesting a widespread distribution of these signal(s). The reasons for this bilateral pattern must be investigated further.

Neurogenesis in the SVZ Induced by TMFS

Magnetic fields (MF) can influence biological systems by generating electrical fields, changing diffusion across membranes, exerting force on charged carriers and magnetic dipoles, and catalyzing reactions involving free radicals (Levin, 2003). Neurite outgrowth and neuronal differentiation of CCs, both in vitro and in vivo, are induced by MF stimulation (Drucker-Colin et al., 1994; Feria-Velasco et al., 1998). It is known that endogenous bioelectromagnetic fields convey morphogenetic informa-

tion for embryonic development and regeneration (for reviews see Levin, 2003; Nuccitelli, 2003). For instance, application of exogenous applied fields increases spinal cord regeneration, whereas disruption of endogenous fields inhibits regeneration. Precursor cells from the neural crest are galvanotactic; i.e., they sense and respond to electrical cues (Gruler and Nuccitelli, 1991). A possible role of endogenous electric fields in directing cell proliferation and migration in the SVZ has not been examined. Conceivably, MF could increase neurogenesis by altering such endogenous electric fields.

TMFS induces neurogenesis in lesioned animals, but not in intact ones. This may derive from the fact that the normal striatal environment does not support neuronal differentiation or migration of transplanted, adult-generated SVZ cells (Herrera et al., 1999). Perhaps the production of local factors associated with denervation or grafting releases inhibition, allowing SVZ precursors to proliferate and differentiate. MF should be more effective in inducing proliferation of SVZ precursors under these conditions.

Induction of TH Expression in Cells Derived From the SVZ

TH is the first and rate-limiting enzyme in dopamine synthesis. Considerable interest exists in regulating the expression of TH in regions of the CNS that have been depleted of dopamine, as a means of restoring catecholaminergic function and, thus, the appearance of newly born TH⁺ cells in the SVZ, and their possible migration into the striatum (Figs. 4, 6) is, potentially, of enormous significance. TH- or dopamine-containing cell bodies are normally absent in the rodent striatum. Their presence in some of our experimental animals suggests that they originate from SVZ neuronal precursors. In principle, this comes as no surprise, in that the SVZ give rise in vivo to olfactory bulb neurons expressing dopamine and γ -aminobutyric acid (GABA; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). However, as mentioned above, adult SVZ cells transplanted into the normal striatum do not migrate or differentiate (Herrera et al., 1999). Perhaps the denervated striatum provides a more suitable environment for SVZ differentiation and migration. Some of the factors that induce expression of TH also induce neurogenesis in the adult SVZ. The combination of FGF-2 with activin (also known as bone morphogenic protein 2; BMP-2) or with glial cell conditioned media stimulates TH gene expression in embryonic and/or adult forebrain SVZ precursors in culture (Daadi et al., 1998; Daadi and Weiss, 1999). BDNF and members of the GDNF family also support the survival and differentiation of midbrain DA neurons (Zhou et al., 1996). Administration of transforming growth factor- α in the striatum of SN-lesioned adult rats or the intraventricular infusion of BDNF also results in the generation of new dopaminergic neurons in the striatum (Fallon et al., 2000; Benraiss et al., 2001).

A subtype of intrinsic striatal dopaminergic interneurons has been identified in the nonhuman primate and human adult striatum (Porritt et al., 2000). These TH⁺

neurons also express the dopamine transporter, indicating that they may be capable of dopaminergic neurotransmission (Betarbet et al., 1997). Interestingly, the population of these dopaminergic cells increases severalfold in monkeys after dopaminergic denervation by MPTP (Betarbet et al., 1997) and in patients with PD (Porritt et al., 2000). Moreover, the number of striatal dopaminergic cells is enhanced in both aged and Parkinsonian monkeys following lentiviral GDNF delivery (Palfi et al., 2002). The increased population of TH⁺ striatal neurons in patients with PD and MPTP-treated monkeys may be a means by which the adult striatum compensates for dopaminergic striatal denervation. It is not known whether these new TH⁺ cells originate from neuronal precursors or from preexisting non-dopaminergic interneurons. Nevertheless, as our results indicate, they may derive from progenitor cells from the SVZ. It remains to be determined whether these newly formed TH⁺ cells, are dopaminergic and, if so, whether they are capable of producing sufficient dopamine to compensate for the loss of dopamine supply and, thus, provide behavioral improvement. The elucidation of the mechanisms underlying these responses of neural progenitors may help to better understand the basic developmental mechanisms and to advance cell restoration therapies focused on the stimulation of proliferation of endogenous neural precursors.

Therapeutic Potential of MF Stimulation in PD

Studies both in animal models of PD and in PD patients argue in favor of a possible therapeutic potential of TMFS. For instance, rats with 6-hydroxydopamine-induced damage of the central dopamine system, exposed for 14 days to an extremely-low-frequency MF, had significantly reduced dopamine hypersensitivity-associated behavior (Sieron et al., 2001). Patients with PD showed significant improvements when assessed for Parkinsonian symptoms up to 6 months after the application of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) daily for 10 days (Mally and Stone, 1999). Other clinical studies have been conducted on the use of rTMS in the treatment of motor dysfunction in PD patients (for review see Shimamoto et al., 2001; Cantello et al., 2002). Although some reports are favorable, others are not and have raised the problem of appropriate control experiments. Animal studies such as that reported here may shed some light on the mechanisms involved and perhaps provide a rationale for improvement of TMFS therapy for patients afflicted with PD.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Blanca Gutiérrez, Marcela Palomero, Verónica Rodríguez, Tatiana Fiordeliso, Sandra Orozco, Fernando Carbajal, Sergio Salgado, and Augusto García Rubio for their technical assistance. We also thank Luis Fernando Oropeza for his assistance with confocal microscopy, Nicolás Jiménez for help in statistical analysis, Clorinda Arias and Gabriel Gutiérrez for advice on BrdU labeling, and María Teresa Torres for typing the manuscript. This work was supported by grants from

CONACyT (25122-M), DGAPA (IN-208799) and Fideicomiso UNAM to R.D.-C. and CONACyT (34329-N) and DGAPA (IN-210401) to A.H.-C.

REFERENCES

- Ahlborn A, Feychting M. 2003. Electromagnetic radiation. *Br Med Bull* 68:157–165.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433–458.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo M. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629–634.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963–970.
- Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. 2001. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 21:6718–6731.
- Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT. 1997. Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 17:6761–6768.
- Björklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Yin Ching Chen I, McNaught KSP, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2344–2349.
- Brundin P, Strecker RE, Widner H, Clarke DJ, Nilsson OG, Astedt B, Lindvall O, Björklund A. 1988. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res* 70:192–208.
- Cameron HA, McKay RD. 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894–897.
- Cantello R, Tarletti R, Civardi C. 2002. Transcranial magnetic stimulation and Parkinson's disease. *Brain Res Rev* 38:309–327.
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Serahi-Bozorgzand N, Manji HK. 2000. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 75:1729–1734.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649–2658.
- Daadi M, Weiss S. 1999. Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci* 19:4484–4497.
- Daadi M, Arcellana-Panlilio MY, Weiss S. 1998. Activin co-operates with FGF2 to regulate tyrosine hydroxylase expression in the basal forebrain ventricular zone progenitors. *Neuroscience* 86:867–880.
- Drucker-Colin R, Verdugo-Diaz L, Mendez M, Carrillo-Ruiz J, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A, Corkidi G. 1994. Comparison between low frequency magnetic field stimulation and nerve growth treatment of cultured chromaffin cells on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties and grafting in nigrostriatal lesion rats. *Mol Cell Neurosci* 5:485–498.
- Dunnett B, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD. 1981. Graft of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 215:147–161.

- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S. 2000. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14686–14691.
- Feria-Velasco A, Castillo-Medina S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suárez S, Sánchez-Gómez C, Drucker-Colín R. 1998. Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. *J Neurosci Res* 53:569–582.
- Gage FH. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612–613.
- Garrett WT, McBride RL, Williams JK Jr, Feringa ER. 1991. Fluoro-gold's toxicity makes it inferior to true blue for long-term studies of dorsal root ganglion neurons and motoneurons. *Neurosci Lett* 128:137–139.
- Gray WP, Sundstrom LE. 1998. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res* 790:52–59.
- Gruher H, Nuccitelli R. 1991. Neural crest cell galvanotaxis: new data and a novel approach to the analysis of both galvanotaxis and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 19:121–133.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2509–2514.
- Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* 46:867–877.
- Hinds JW. 1968. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 134:287–304.
- Hsu SM, Raine L, Martin HF. 1981. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75:92–95.
- Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Greenberg DA. 2002. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 110:311–319.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:343–347.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092–1094.
- Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Alvarez-Buylla A. 1999. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19:2171–2180.
- Kriegstein K, Unsicker K. 1997. Protein from chromaffin granules promotes survival of mesencephalic dopaminergic neurons by an EGF-Receptor ligand-mediated mechanism. *J Neurosci Res* 48:18–30.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects of neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820–5829.
- Levin M. 2003. Bioelectromagnetics in morphogenesis. *Bioelectromagnetics* 24:295–315.
- Li Y, Chen J, Chopp M. 2002. Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats. *J Neurol Sci* 193:137–146.
- Lim DA, Tramontin AD, Trebejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2000. A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713–726.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768–7778.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145–1181.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 264:978–981.
- Mally J, Stone TW. 1999. Improvement in Parkinsonian symptoms after repetitive transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci* 162:179–184.
- Mehler MF, Gokhan S. 1999. Postnatal cerebral cortical multipotent progenitors: regulatory mechanisms and potential role in the development of novel neural regenerative strategies. *Brain Pathol* 9:515–526.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
- NIH. 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services publ. No. 85-23.
- Nuccitelli R. 2003. Endogenous electric fields in embryos during development, regeneration and wound healing. *Radiat Prot Dosimetry* 106:375–383.
- Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R, Deglon N, Hantraye P, Aebischer P, Kordower JH. 2002. Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 22:4942–4954.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Greschwind 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 JM, Valentin VV, Lowenstein DH. 2002a. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci* 22:3174–3188.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. 2002b. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52:802–813.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. 2001. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706–6717.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1999. The subependymal layer in rodents: A site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* 49:221–243.
- Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW. 2000. New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 355:44–45.
- Shimamoto H, Takasaki K, Shigemori M, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H. 2001. Therapeutic effects and mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in Parkinson's disease. *J Neurol* 248:48–52.
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. 2001. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21:9733–9743.
- Sieron A, Brus R, Szkilnik R, Plech A, Kubanski N, Cieslar G. 2001. Influence of alternating low frequency magnetic fields on reactivity of central dopamine receptors in neonatal 6-hydroxydopamine-treated rats. *Bioelectromagnetics* 22:479–486.
- Szele FG, Chesselet M. 1996. Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J Comp Neurol* 368:439–454.
- Thomas LB, Gates MA, Steindler DA. 1996. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* 17:1–14.
- Wahlfors J, Loimas S, Pasanen T, Hakkarainen T. 2001. Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. *Histochem Cell Biol* 115:59–65.
- Wessendorf MW. 1991. Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res* 553:135–148.
- Zhou J, Pliego-Rivero B, Bradford HF, Stern GM. 1996. The BDNF content of postnatal and adult rat brain: the effects of 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res Dev Brain Res* 97:297–303.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11:234–245.

REFERENCIAS

Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.*, 15:2896-903.

Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.*, 85: 523-569.

Ahlskog JE, Kelly PJ, Van Heerden JA, Stoddard SL, Tyce GM, Windebank J, Bailey PA, Bell GN, Blexrud MD, Carmichael SW. (1990) Adrenal medullary transplantation into the brain for treatment of Parkinson's disease: clinical outcome and neurochemical studies. *Mayo Clin. Proc.*, 65:305-328.

Aimone JB, Wiles J, Gage FH. (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature neurosci.* 9:723-727.

Albin RL, Young AB, Penney JB. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TINS.* 12:366-374.

Allen GS, Burns RS, Tullipan MB. (1989) Adrenal medullary transplantation to the caudate nucleus in Parkinson's disease. Initial clinical results in 18 patients. *Arch. Neurol.* 46:487-491.

Altman J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol.* 136:269-93.

Altman J. Das GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124: 319-335.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2:287-93.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neuroscience.* 22: 629-634.

Alvarez-Buylla A, Lim DA. (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 4:683-86.

Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. (1990) Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron.* 5:101-109.

Arias-Carrión O, Drucker-Colín R, Murillo-Rodríguez E. (2005) Survival rates through time of hypocretin grafted neurons within their projection site. *Neuroscience letters.* 404: 93-97.

Arias-Carrión O, Drucker-Colín R. (2004) Plasticidad cerebral y campos magnéticos. *Temas Selectos de Neurociencias III*. Pags., 169-180. Ed. Javier Velásquez Moctezuma, U.A.M.

Arias-Carrión O, Hernandez-Lopez S, Ibáñez O, Bargas J, Hernandez-Cruz A, Drucker-Colín R. (2006) Differentiation into DA-like cells of neuronal precursor within the SVZ in grafted nigro-striatal lesioned rats. *J. Neuroscience Research*. En prensa.

Arias-Carrión O, Murillo-Rodriguez E, Xu M, Blanco-Centurion C, Drucker-Colín R, Shiromani PJ. (2004) Transplant of hypocretin neurons into the pontine reticular formation: preliminary results. *Sleep*. 27:1465-1470.

Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. (2006) Neurogenesis en el Cerebro adulto. *Rev. Neurol.* (España) En prensa.

Arias-Carrión O, Verdugo-Díaz L, Feria-Velasco A, Millán-Aldaco D, Gutiérrez A, Hernández-Cruz A, Drucker-Colín R. (2004) Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigro-striatal lesions. *J. Neuroscience Research*. 78:16-28.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Med* . 8:963-970.

Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur. J. Neurosci*. 14: 10-18.

Auvergne R, Lere C, El Bahh B, Arthaud S, Lespinet V, Rougier A, Le Gal-LaSalle G. (2002) Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Res*. 954: 277-285.

Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L. (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J. Neurosurg.*, 62:169-173.

Banasr M, Hery M., Brezun JM, Daszuta A. (2001) Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.*, 14:1417-24.

Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. (1985) Noninvasive magnetic stimulation of the human motor cortex. *Lancet*. 1: 1106-1107.

Barker RA. (2002) Repairing the brain in Parkinson's disease: Where next? *Mov. Disord.*, 17:233-241.

Barnea A, Nottebohm F. (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 11:217-21.

Barnea A, Nottebohm F. (1996) Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93:714-8.

Bauer S, Moyses E, Jourdan F, Colpaert F, Martel JC, Marien M. (2003) Effects of the alpha 2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat *in vivo*: selective protection against neuronal death. *Neuroscience.*, 117: 281–291.

Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 23:10411-10418.

Ben-Ari Y, Khalilov I, Represa A, Gozlan H. (2004) Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci.* 27: 422–7.

Bernier PJ, Parent A. (1998) Bcl-2 protein as a marker of neuronal immaturity in postnatal primate brain. *J Neurosci.* 18:2486-97.

Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT (1997). Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci.* 17:6761-6768.

Bickford RG, Fremming BD. (1965) Neural stimulation by pulsed magnetic fields in animals and man. Digest of the 6th International Conference on Medical Electronics and Biological Engineering. Tokyo. Pag: 6.

Bizon JL, Gallagher M. (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci.* 18:215-9.

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

Björklund LM, Sanchez-Pernate R, Chung S, Andersson T, Ching-Chen IY, McNaught KP, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:2344-2349.

Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M. (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging.*, 25:333-40.

Bonfanti L Peretto P, Merighi A, Fasolo A. (1997) Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience.*,81:489-502.

Bonfanti L, Theodosis DT. (1994) Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience.* 62:291-305.

Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC. (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429: 523–30.

Breasted JH. (1930). *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. The University of Chicago Press. Chicago: 2 volumenes.

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

Brezun JM, Daszuta A. (2000) Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *EurJ Neurosci*. 12:391–396.

Cadwell J. (1991) Optimizing magnetic stimulator design. In Levy WJ, Cracco RQ, Barker AT, Rothwell J, eds. *Magnetic motor stimulation: basic principles and clinical experience*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Cameron HA, McEwen BS, Gould E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci.*, 15:4687-4692.

Cameron HA, McKay RD. (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*. 2: 894–897.

Cameron HA, McKay RD. (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 435:406-17.

Cameron HA, Tanapat P, Gould E. (1998) Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience*. 82: 349–354.

Cantello R, Tarletti R, Civardi C. (2002) Transcranial magnetic stimulation and Parkinson's disease. *Brain Res Rev*. 38:309-327.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 6:507-18.

Catalano SM, Shatz CJ. (1998) Activity-dependent cortical target selection by thalamic axons. *Science* 281: 559–62.

Check E. (2002) Parkinson's patients show positive response to implants. *Nature*. 416:666.
Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D. (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*. 19:4462-71.

Cohen D, Cuffin BN. (1991) Developing a more focal magnetic stimulator. Part 1: some basic principles. *J Clin Neurophysiol.* 8: 10211.

Cohen LG, y col., (1990) Effects of coil design on delivery of focal magnetic stimulation. Technical considerations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 75: 3507.

Coopler O, Isacson O. (2004) Intrastratial transforming growth factor α delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 24:8924-8931.

Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA. (1993) Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett.* 149:111-114.

Cotzias GC, Van Woert, MH, Schiffer LM. (1967). Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism. *N. Engl. J. Med.*, 276:374-379.

Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Koog D. (1996) *In vivo* growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci.* 16 :2649-2658.

Cremer H, y col., (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature.*, 367:455-9.

Cunnington R, Iansek R, Thickbroom GW. (1996) Effects of transcranial magnetic stimulation over supplementary motor area on movement in Parkinson's disease. *Brain.* 119: 815-822.

Curtis MA, Penney EB., Pearson AG., Roon-Mom WM., Butterworth NJ., Dragunow M, Connor B et al.(2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100:9023-9027.

D'Arsonval A. (1896) Dispositifs pour la mesure des courants alternatifs de toutes fréquences. CR Société Biologique (Paris). 2: 450-451.

Dantzer JL, Callaway EM. (1998) The development of local, layer-specific visual cortical axons in the absence of extrinsic influences and intrinsic activity. *J Neurosci* 18: 4145-54.

Date, I. (1996) Parkinson's Disease, Trophic Factors, and Adrenal Medullary Chromaffin Cell Grafting: Basic and Clinical Studies. *Brain Research Bulletin.* 40: 1.19.

Date, I., and Ohmoto, T. (1996) Neural transplantation and trophic factors in Parkinson's disease: Special reference to chromaffin cell grafting, NGF support from pretransected peripheral nerve, and encapsulated dopamine-secreting cell grafting. *Exp. Neurol.*, 137:333-344.

Date, I., Imaoka, T., Myshohi, Y., Ono, T., Asar, S and Ohmoto, T. (1996) Chromaffin cell survival and host dopaminergic fiber recovery in a patient with Parkinson's disease treated by cogafts of adrenal medulla and pretransected peripheral nerve. Case report. *J. Neurosurg.*, 84:685–689.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney, D., Kassissieh, S., Dempsey, P and Isacson, O. (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat. Med.*, 3:350–353.

Del Conte, G. (1907). Einpflanzungen von embryonalem Gewebe ins Gehirn. *Beitr. Pathol. Anat.*, 42:193–201.

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM., Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.*, 17:5046-5061.

Doetsch F. (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.*, 6:1127-34.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, DA., García-Verdugo, JM., Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97: 703-716.

Drucker-Colín R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Fernández-Cancino F, Bermúdez-Rattoni F. (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: Diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311:353–357.

Drucker-Colín R, Madrazo I, Ostrosky-Solís F, Skhurovich M, Franco R, Torres C. (1988) Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Prog. Brain Res.* 78:67-574.

Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruiz J, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A, Corkidi G. (1994). Comparison between low frequency magnetic (LFM) field stimulation and nerve growth factor (NGF) treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties and grafting in nigro-striatal lesioned rats. *Mol. Cell. Neurosci.* 5:485–498.

Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Morgado-Valle C, Solís-Maldonado G, Ondarza R, Boll C, Miranda G, Wang GJ, Volkow N. (1999). Transplant of cultured neuron-like differentiated chromaffin cells in a Parkinson's disease patient: A preliminary report. *Arch. Med. Res.* 30:33–39.

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

Drucker-Colin R., Garcia-Hernandez F., Mendoza-Ramirez L., Pacheco-Cano MP and Komisaruk BK. (1990) Possible mechanisms of action of adrenal transplants in Parkinson's

disease. *Prog. Brain Res.* 82: 509-513.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. (1997) Molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 54:97–606.

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

Dunn EH. (1917). Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 27:565-582.

Dunnett SB, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD. (1981) Graft of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 215, 147-161.

Eckenhoff MF, Rakic P. (1998) Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J Neurosci.*, 8:2729-47.

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:13632-13637.

Ekdahl CT, Mohapel P, Elmer E, Lindvall O. (2001) Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitorcell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 14: 937-945.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.* 4: 1313–1317.

Fahn S. (1986) Parkinson's disease and other basal ganglion disorders. In Asbury, AK, McKlann GM, McDonald WI. (eds.), *Clinical Neurobiology.* London. Saunders, pp. 1217–1228.

Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Bartatta J, Kore M, Endo TL, Doung A, Nguyen G, Kerkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S. (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14686-14691.

Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ. (2001) Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron.* 6:911-26.

Feria-Velasco A, Castillo-Medina S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suárez S, Sánchez-Gómez C, Drucker-Colín R. (1998) Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: An histological and ultrastructural comparative study. *J. Neurosci. Res.* 53:569-582.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 23:373-82.

Fine A, Hunt SP, Oertel WH, Nomoto M, Chuong PN, Bond A, Waters C, Temlett JA, Annett L, Dunnett S, Jenner P, Marsden CD. (1988) Transplantation of embryonic marmoset dopaminergic neurons to the corpus striatum of marmosets rendered parkinsonian by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. In Gash DM, Sladek JR, Jr. (eds.), *Transplantation in the Mammalian CNS*, Elsevier, Amsterdam, pp. 479-489.

Fisher LJ, Gage FH. (1993) Grafting in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, 73:583–616.

Flerko B, Szentagothai J. (1957) Oestrogen sensitive nervous structures in the hypothalamus. *Acta Endocrinol Copenh.*, 26:121–127.

Flielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P. (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:10177-10182.

Frederiksen K., McKay RD. (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.*, 8:1144-51.

Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL. (1992) Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12–46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 327:1549–1555.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JW, Eidelberg D, Fahn S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 344:710-19.

Freed WJ, Cannon-Spoor E, Krauthamer E. (1986) Intrastratial adrenal medulla grafts in rats: long-term survival and behavioral effects. *J. Neurosurg.*, 65: 664-670.

Freed WJ, Morihisa JM, Spoor E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, Wyatt RT. (1981) Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behavior. *Nature (Lond)*. 92: 351-352.

Freed WJ, Morishisa SM, Spoo E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, Wyatt RJ. (1981). Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behavior. *Nature.*, 292:351-52.

Fukushima N, Yokouchi K, Kawagishi K, Moriizumi T. (2002) Differential neurogenesis and gliogenesis by local and migrating neural stem cells in the olfactory bulb. *Neurosci Res.* 44:467-73.

- Gage FH. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*. 287:1433-1438.
- Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Vargas J. (1999). Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci*. 9:3629-3638.
- Garrett WT, McBride RL, Williams JK Jr, Feringa ER. (1991) Fluoro-gold's toxicity makes it inferior to true blue for long-term studies of dorsal root ganglion neurons and motoneurons. *Neurosci Lett*. 128: 137-139.
- Ghabra MB, Hallett M, Wassermann EM. (1999) Simultaneous repetitive transcranial magnetic stimulation does not speed fine movement in PD. *Neurology*. 52:768-70.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1823-8.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1823-8.
- Goetz CG, Olanow CW, Koller WC, Penn RD, Cahill D, Morantz R, Stebbins G, Tanner CM, Klawans HL, Shannon KM, Comella CL, Witt T, Cox C, Wasman M, Cauger L. (1989). Multicenter study of autologous adrenal medullary transplantation of the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 320:337-341.
- Goetz CG. (1992) Adrenal medulla. *Clin. Restor. Neurol. Neurosci*. 4:194.
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*. 12:3642-50.
- Gould E, Cameron HA, McEwen BS. (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.*, 340:551-65.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.*, 17:2492-8.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 286: 548-552.
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ. (1999) Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci.*, 3:186-192.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95:3168-71.

Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. (2000) Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry*. 48:715-20.

Gould E. (1994) The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann N Y Acad Sci*. 743:73-92; discussion 92-3.

Gould E. (1999) Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 21: 46S–51S.

Grace AA, Bunney BS (1983a). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons 1. Identification and characterization. *Neuroscience*. 10:301-315.

Grace AA, Bunney BS (1983b). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons. 2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience*. 10:317-331.

Grace AA, Bunney BS (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci*. 11:2866-2876.

Grace AA, Bunney BS. (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci*. 11:2877-2890.

Grace AA, Onn SP (1989) Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci*. 9:3463-3481.

Gruler H, Nuccitelli R. (1991) Neural crest cell galvanotaxis: new data and a novel approach to the analysis of both galvanotaxis and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 19:121-133.

Halász, B, Popp L, Vhlarik S, Tima L. (1965). Further studies on the hormone secretion of the anterior pituitary transplanted into the hypophysiotrophic area of the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 77:343-355.

Hallbergson AF, Gnatenco C, Peterson DA. (2003) Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair. *J Clin Invest.*, 112:1128-33.

Hallett M. (2000) Transcranial magnetic stimulation and the brain human. *Nature*. 406: 147-150.

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M. (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol*. 229:15-30.

Hastings NB, Gould E. (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol.*, 413:146-54.

Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard, AC, Rao MS, Mattson MP. (2002) Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 83: 1509–1524.

Haughey, NJ., Liu, D., Nath, A., Borchard, AC., Mattson, MP. (2002) Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.*, 1: 125–135.

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2509-2514.

Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999) Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol.* 46:867–877.

Hitchcock ER, Kenny BG, Clough CG, Hughes RC, Henderson BT, Detta A. (1990) Stereotactic implantation of fetal neosencephalon. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 54:282–289.

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.*, 7: 726–735.

Holden C. (2002). Versatile cells against intractable diseases. *Science.*, 297:500–502.

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

Hsu SM, Raine L, Martin HF. (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 75, 92-95.

Hurtig H, Joyce J, Sladek JR, Trojanowski JQ. (1989) Postmortem analysis of adrenal-medullato- caudate autograft in a patient with Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 25:607-614.

Itakura T, Uematsu Y, Nakao N, Nakai E, Nakai K. (1997). Transplantation of autologous sympathetic ganglion into the brain with Parkinson's disease. Long-term follow-up of 35 cases. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 69:112–115.

Jacobs B, Tanapat P, Reeves A, Gould E. (1998) Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via 5-HT1A receptor in the adult brain. *Soc. Neurosci Abstr.*, 24, 1992.

Jacques TS, Relvas JB, Nishimura S, Pytela R, Edwards GM, Streuli CH, french-Constant C. (1998) Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins. *Development.*, 125:3167-77.

Jankovic J, Grossman R, Goodman C, Pirozzolo F, Schneider L, Zhu Z, Scardino P, Garder

AJ, Jhingran SG, Jhingram SG, Martin S. (1989) Clinical, bioquimical, and neurophathologic findings following transplantation of adrenal medulla to the caudate nucleus for treatment of Parkinson's Disease. *Neurology*. 39:1227-1243.

Jenner PN. (1992). Paroxetine:Anoverview of dosage, tolerability and safety. *Int. Clin Psychopharmacol*. 4:69-80.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 98: 4710–4715.

Jin K, Peel, AL, Mao, XO, Xie, L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101: 343–347.

Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, Greenberg DA. (2003) Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci.*, 24: 171–189.

Jin K, y col., (2002) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression *in vitro* and stimulation of neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J Neurosci*. 22: 5365–5373.

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 99: 11946–11950.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 96:25-34.

Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW. (1985) Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.*, 239:117-25.

Kempermann G, Kronenberg G. (2003) Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry.*, 54:499-503.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.*, 386:493-5.

Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 14:186-91.

Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. (2002) Dopamine neurons

derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 418: 50-56.

Kintner C. (2002) Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci*. 22:639-43.

Kishi K. (1987) Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *J Comp Neurol.*, 258:112-24.

Kokaia Z, Lindvall O. (2003) Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Op. Neurobiol*. 13: 127–132.

Kolarik J, Nadvornik P, Dvorak M, Andrs M. (1988) Crossed transvertebral puncture to block spinal ganglion in treatment of pain. *Zentralbl. Neurochir*. 49:185–188.

Komuro H, Rakic P. (1998) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol*. 37: 110-30.

Kordower, JH, Cochran E, Penn RD, Goetz CG. (1991) Putative chromaffin cell survival and enhanced host-derived TH-fiber innervation following a functional adrenal medulla autograft for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 29:405–412.

Kornack DR, Rakic P. (2001) Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science.*, 294:2127-30.

Koutouzis TK, Emerich DF, Borlongan CV, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. (1994). Cell transplantation for central nervous system disorders. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 8:125–162.

Kriegstein K, Unsicker K. (1997) Protein from chromaffin granules promotes survival of mesencephalic dopaminergic neurons by an EGF-Receptor ligand-mediated mechanism. *J Neurosci Res*. 48:18-30.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.*, 16:2027-33.

Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.*, 17:5820-9.

Kuhn, HG, Palmer TD, Fuchs E. (2001) Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 251:152-8.

Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA. (2002) Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci.*, 16: 2008–2012.

- Lacey MG, Mercuri NB, North RA. (1989) Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci.* 9:1233-1241.
- Lacy-Hulbert A, Metcalfe J, Hesketh R. (1998) Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB Journal.* 12:395-420.
- Langston JW, Irwin I, Ricaurte GA. (1987). Neurotoxins, Parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.*, 32: 19-49.
- Laywell ED, Kukekov VG, Steindler DA. (1999) Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp Neurol.* 156:430-3.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13883-8.
- Le Gross Clark WE. (1940). Neuronal differentiation in implanted foetal cortical tissue. *J. Neurol. Psychiatry (Lond.)* 3:263–272.
- Lee J, Duan W, Mattson MP. (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.*, 82: 1367–1375.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97:11032-7.
- Lenington JB, Yang Z, Conove JC. (2003) Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol.*, 1:99.
- Levin M. (2003) Bioelectromagnetics in morphogenesis. *Bioelectromagnetics.* 24:295-315.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ. (1995) Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 15:7810–7820.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96:7526-31.
- Lindvall O, Backlund EO, Farde L. (1987). Transplantation in Parkinson's disease: Two cases of adrenal medullary autografts to the putamen. *Ann. Neurol.* 22:457–468.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KI, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, Björklund A. (1990). Grafts of fetal dopamine

neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.*, 247:574–577.

Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. (2004). Stem Cell Therapy for Human Neurodegenerative Disorders-How to Make it Work. *Nature Medicine*. Neurodegeneration. S42-S50.

Lindvall O. (1989). Transplantation into the human brain: Present status and future possibilities. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (Suppl.)*: 39–54.

Lledo PM, Alonso M, Grubb M. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience.*, 7: 179-193.

Lois C, Alvarez-Buylla A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2074-7.

Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.*, 264:1145–1181.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science.*, 271:978-81.

López-Lozano JJ, Bravo G, Abascal J, Brera B, Santos H, Gómez-Angulo C. (1992). The CPH Neural Transplantation Group. Co-transplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in Parkinson's disease. *Lancet.*, 339:430.

López-Lozano JJ, Bravo G, Abascal J. (1991) The CPH Neural Transplantation Group grafting of perfused adrenal medullary tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *J.Neurosurg.*, 75:234–243.

López-Lozano JJ, Bravo G, Brera B, Millan I, Dargallo J, Salmean J, Uria J, Insausti J. (1997) Long-term improvement in patients with severe Parkinson's disease after implantation of fetal ventral mesencephalic tissue in a cavity of the caudate nucleus: 5-Year follow up in 10 patients. *J. Neurosurg.*, 86:931–942.

Luskin MB (1998) Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J Neurobiol.* 36:221-233.

Luskin MB. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.*, 11:173-189.

Macklis JD. (2001) Neurobiology: new memories from new neurons. *Nature.*, 410: 314-317.

Madrazo I, Drucker-Colín R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. (1987) Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 316:831–834.

Madrazo I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solis F. (1990) Neural transplantation (autoadrenal, fetal nigral and fetal adrenal) in Parkinson's disease: The Mexican experience. *Prog. Brain Res.*, 82:593-602.

Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. 405:951-955

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.*, 127:5253-63.

Malberg JE. (2004) Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci.*, 29:196–205.

Mally J, Stone TW. (1999) Improvement in Parkinsonian symptoms after repetitive Transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci.* 162:179-184.

Marin O, Rubenstein JL. (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 26: 441–83.

Markakis EA, Gage FH. (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol.*, 406:449-60.

Martino G, Pluchino S. (2006) The therapeutic potential of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience.* 7:395-406.

Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci.* 24:1726–1733.

Mason HA, Ito S, Corfas G. (2001) Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci.* 19:7654-63.

Mendoza-Ramírez JL, Aguilar-Roblero R, Zainos-Rosales A, Drucker-Colín R. (1991) Fetal substantia nigra and adrenal medullary grafts placed contralateral to the nigrostriatal lesion side induce a decrease in turning behavior but not in dopamine receptor density. *Restor. Neurol. Neurosci.* 3:277–285.

Mennerick S, Zorumski CF. (2000) Neural activity and survival in the developing nervous system. *Mol Neurobiol.* 22: 41–54.

- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G. (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current I_h in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci.* 7:462-469.
- Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:17528-17532.
- Merton PA, Morton HB. (1980) Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature.* 285: 227.
- Mirescu C, Peters JD, Gould E. (2004) Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci.* 7:841-6.
- Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M. (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron.* 13:727-41.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science.* 302: 1760–1765.
- Morgado-Valle C, Verdugo-Díaz L, García DE, Morales-Orozco Ch, Drucker-Colin R. (1998) The role of voltage-gated Ca^{2+} channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency/ (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res.* 291: 217-230.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.*,13:1071-82.
- Morshead CM, van der Kooy D. (1992) Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci.*,12:249-56.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116:201–211.
- Nacher J, Rosell DR, Alonso-Llosa G, McEwen BS. (2001) NMDA receptor antagonist treatment induces a longlasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.*, 13, 512–520.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol.* 39:569-78.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.*, 409:714-20.

Nuccitelli R. (2003) Endogenous electric fields in embryos during development, regeneration and wound healing. *Radiat Prot Dosimetry* 106:375-383.

Olanow CW, Korkower JH, Freeman TB. (1996). Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci.*, 19:102–109.

Olson L, Backlund EO, Ebendal T, Freedman R, Hamberger B, Hansson P, Hoffer BJ, Lindbloom U, Myerson B, Stromberg I, Sydow O, Seiger, A. (1991) Intraputamenal infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson's disease. One-year follow-up of first clinical trial. *Arch. Neurol.*, 48:373–381.

Ormerod BK, Galea LA. (2001) Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience.*, 102:369-79.

Oyesiku NM, Bakay RA. (1993) Central nervous system transplantation. In Crockard A, Hayward R, Hoff JT. (eds) *Neurosurgery: The Scientific Basis of Clinical Practice*, Blackwell Scientific, London., 448–469.

Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R, Deglon N, Hantraye P, Aebischer P, Kordower JH. (2002) Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci.* 22:4942-4954.

Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P., Kaspar B., Stein SA, Gage FH. (2001) Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature.*, 411:42-3.

Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH. (2002) Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci.*, 22: 3174–3188.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, 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 JM. (2002) The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res.*, 50: 179–189.

Parkinson J. (1987) *An Essay on the Shaking Palsy*. Londres, Sherwood Neely and Jones, Reprinted in Critchley M, Mc Mememey W.H, Walshe F.M.R, Greenfield JG (eds), *James Parkinson (1755-1824) A bicentenary volume of papers Dealing with Parkinson Disease*. Londres, Macmillan, 1955.

Pascual-Leone A, Grafman J, Cohen LG, Roth BJ, Hallett M. (1997) Transcranial magnetic stimulation. A new tool for the study of higher cognitive functions in humans. In Grafman J, Boller F, eds. *Handbook of Neuropsychology*. Vol. 11. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Pascual-Leone A, Valls-Sole J, Brasil-Neto JP, Cammarota A, Grafman J, Hallett M. (1994) Akinesia in Parkinson's disease. II. Shortening of choice reaction time and movement time with subthreshold repetitive transcranial motor cortex stimulation. *Neurology*. 44: 892-8.

Pascual-Leone A, Wassermann EM. (1996) Repetitive transcranial magnetic stimulation: applications and safety considerations. In Nilsson J, Panizza M, Grandori F, eds. *Advances in Magnetic Stimulation. Mathematical modeling and clinical applications*. Pavia: PIME Press.

Pascual-Leone A, y col., (1992) No evidence of hearing loss in humans due to transcranial magnetic stimulation. *Neurology*. 42: 64751.

Pascual-Leone A, y col., (1993) Safety of rapid rate transcranial magnetic stimulation in normal volunteers. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 89: 12030.

Pascual-Leone A, y col., (1996) Reorganization of human cortical motor output maps following traumatic forearm amputation. *Neuroreport*. 7: 2068–2070.

Paus T, Jech R, Thompson CJ, Comeau R, Peters T, Evans AC. (1997) Transcranial magnetic stimulation during positron emission tomography: a new method for studying connectivity of the human cerebral cortex. *J Neurosci*. 17: 317884.

Paxinos G, Watson C. (1996) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA, USA: Academic Press.

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*. 21:6706-17.

Penn RD, Goetz CG, Tanner, CM, Klawans HL, Shannn KM, Comella CL, Witt TR. (1988). The adrenal medullary transplant operation for Parkinson's disease: Clinical observations in five patients. *Neurosurgery*., 22:999–1022

Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfant L. (1999) The subependymal layer in rodents: A site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull*. 49:221–243.

Perlow M, Freed WJ, Hoffer B, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*., 204:643–647.

Perlow MJ, Kokoris G, Gibson MJ, Silverman AJ, Kreiger DT, Zimmerman EA. (1987) Accessory olfactory bulb transplants correct hypogonadism in mutant mice. *Brain Res*., 415:158–162.

Peterson DA. (2002) Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol.* 2:34-42

Poltorak M, Isono M, Freed WJ, Ronnett GV, Snyder SH. (1992) Human cortical neuronal cell line (HCN-1): Further in vitro characterization and suitability for brain transplantations. *Cell Transplant.*, 1:3-15.

Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW (2000). New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet.* 9223:44-45.

Price J, Williams BP. (2001) Neural stem cells. *Curr Opin Neurobiol.* 11:564-567.

Puopolo M, Belluzzi O (1998) Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Eur J Neuroscience.* 10: 1073-1083

Radley JJ, Jacobs BL. (2003) Pilocarpine-induced status epilepticus increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism. *Brain Res.*, 966: 1–12.

Rakic P, Sidman RL. (1973) Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70:240-4.

Rakic P. (1995) Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:11323-7.

Ranson SW. (1909) Transplantation of the spinal ganglion into the brain. *Q. Bull. Northwest. Univ. Med. Sch.* 11:176–178.

Reh TA. (2002) Neural stem cells: form and function. *Nat Neurosci.* 5: 392–4.

Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 255:1707-10.

Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. (2000) Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. *J Comp Neurol*, 428, 240–253.

Robinson, K. R. (1985) The responses of cells to electrical fields: a review. *J. Cell. Biol.* 101:2023-2027.

Roisen FJ, Klueber KM, Lu CL, Hatcher LM, Dozier A, Shields CB, Maguire S. (2001) Adult human olfactory stem cells. *Brain Res.* 890:11-22.

Romero-Aleman Mdel M, Monzon-Mayor M, Yanes C, Arbelo-Galvan JF, Lang D, Renau-Piqueras J, Negrin-Martinez C. (2003) S100 immunoreactive glial cells in the forebrain and midbrain of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. *J Neurobiol.* 57:54-66.

Rosas HD, Koroshetz WJ, Chen YI, Skeuse C, Vangel M, Cudkowicz ME, Caplan K. (2003) Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, 60:1615-1620.

Rothwell JC, Thompson PD, Day BL, Boyd S, Marsden CD. (1991) Stimulation of the human motor cortex through the scalp. *Exp Physiol*. 76: 159-200.

Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A. (1995) Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol*. 351:51-61.

Salthun-Lassalle B, Hirsch EC, Wolfart J, Ruberg M, Michel PP. (2004) Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels. *J Neurosci*. 24: 5922-30.

Sanberg PR, Norman AB. (1988). Adrenal transplants for Huntington's disease? *Nature* 335:122.

Sapolsky RM. (1992) Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging*, 13: 171-174.

Sawle GV, Bloomfield PM, Bjorklund A, Brooks DJ, Brundin P, Leenders KL, Lindvall O, Marsden CD, Rehnerona S, Widner H, Frackowiak R. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F] 6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol*. 31:166-173.

Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*, 20:6144-6158.

Scharfman HE, Sollas AE, Berger RE, Goodman JH, Pierce JP. (2003) Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Neuroscience*, 121:1017-1029.

Scharfman HE. (2004) Functional implications of seizure-induced neurogenesis. *Adv Exp Med Biol.*, 548:192-212.

Seaberg RM, van der Kooy D. (2002) Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*. 22:1784-93.

Seiger A, Olson L. (1997) Quantification of fiber outgrowth in transplanted central monoamine neurons. *Cell Tissue Res*. 179:285-316.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 478:359-78.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.*, 21:7153-60.

Shimamoto H, Takasaki K, Shigermori M, Imaizumi T, Ayabe M, shoji H, (2001) Therapeutic effects and mechanism of repetitive Transcranial magnetic stimulation in Parkinson's disease. *J neurol.* 248:48-52.

Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science.* 299:117-20.

Shirai Y. (1921). On the transplantation of rat sarcoma in adult heterogeneous animals. *Jpn. Med. World* 1:14–15.

Shors TJ, Miesegae G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410:372-376.

Sieron A, Brus R, Szkilnik R, Plech A, Kubanski N, Cieslar G. (2001) influence of alternating low frequency magnetic field on reactivity of central dopamine receptor in neonatal 6-hydroxidopamine-treated rats. *Bioelectromagnetics.* 22:479-486.

Sladek JR, Collier TJ. (1988) Fetal dopamine neural grafts: Extended reversal of methylphenyltetrahydropine-induced Parkinsonism in monkeys. *Prog. Brain Res.* 78:497-506.

Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB, Insel TR. (2001) Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm Behav.* 39:11-21.

Song HJ, Stevens CF, Gage FH. (2002) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci.* 2002 5:438-45.

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 25:10-8.

Spitzer NC, (2002) Kingston PA, Manning TJ, Conklin MW. Outside and in: development of neuronal excitability. *Curr Opin Neurobiol* 12: 315–23.

Spitzer NC, Root CM, Borodinsky LN. (2004) Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends Neurosci* 27: 415-21.

Stanfield BB, Trice JE. (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72:399-406.

Stromberg I, Herrera-Marschitz M, Undergsted U, Ebendal T, Olson L. (1985) Chronic implants of chromaffin tissue into the dopamine-denervated striatum. Effects of NGF on

- graft survival, fiber outgrowth and rotational behavior. *Exp. Brain Res.* 69:335-349.
- Tamamaki N, Nakamura K, Okamoto K, Kaneko T. (2001) Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res.* 41:51-60.
- Tanapat P, Hastings NB, 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 Comp Neurol.* 481:252-65.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci.* 19:5792-801.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, 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.
- Tandé D, Höglinger G, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, François C. (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain.* 129:1194-1200.
- Tello JF. (1911) La influencia del neurotropismo en la regeneración de los centros nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 9:123-160.
- Tepper JM, Sawyer SF, Groves PM. (1987). Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci.* 9:2794-2806.
- Tergau F, Wassermann EM, Paulus W, Ziemann U. (1999) Lack of clinical improvement in patients with Parkinson's disease after low and high frequency rTMS. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 51(Supl): 281-8.
- Thomas LB, Gates MA, Steindler DA. (1996) Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia.* 17:1-14.
- Thompson, W. G. (1890) Successful brain grafting. *N.Y. Med. J.* 51:701-702.
- Tischler AS, Lee YC, Slayton VW, Bloom SR. (1982) Content and release of neurotensin in PC12 pheochromocytoma cell cultures: modulation by dexamethasone and nerve growth factor. *Regul Pept.* 3:415-421.
- Topka H, y col., (1999) A cerebellar-like terminal and postural tremor induced in normal man by transcranial magnetic stimulation. *Brain.* 122:1551-62.

Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*. 13:580-7.

Treves A, Rolls ET. (1994) Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*. 4:374-91.

Tsai RY, Kittappa R, McKay RD. (2002) Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell*. 2:707-12.

Ungeistedt U, Arbuthnott, GW. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*. 18:485-493.

Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. (1978) Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 75:3498-3502.

Unsicker K, Vey J, Hofmann HD, Müller TH, Wilson AJ. (1984) C6 glioma cell-conditioned medium induces neurite outgrowth and survival of rat chromaffin cells in vitro: Comparison with the effects of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 81, 2242-2246.

Vallieres L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. (2002) Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*. 22:486-492.

Van Kampen JM, Hagg T, Robertson HA. (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 BR, Sejnowski TJ, Gage FH. (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:13427-31.

Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415:1030-1034.

Verdugo-Díaz L, Palomero-Rivero M, Drucker-Colín R. (1998) Differentiation of chromaffin cells by extremely low frequency magnetic field changes ratios of catecholamine type messenger. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 46:297-300.

Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R. (2002) Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs*. 171:64-76.

Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C. (2003) Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp*

Neurol., 457:404-19.

Walsh V, Cowey A. (2000) Transcranial magnetic stimulation and cognitive neuroscience. *Nature Rev Neurosci.* 1: 73-79.

Wang DD, Krueger DD, Bordey A. (2003) Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ. *J Neurophysiol.* 90:2291-2302.

Wang H, Sagen J. (1994) Optimization of adrenal medullary allograft conditions for pain alleviation. *J. Neural Transplant. Plast.*, 5:49-64.

Wassermann EM. (1998) Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 105: 1-17.

Waters CH, Apuzzo, MLJ, Neal JH, Weiner LP, Weiner LP. (1992) Long-term follow-up of adrenal medullary transplantation for Parkinson's Disease. *J. Geriatry Psychiatry Neurol.* 5: 35-39.

Watts AE, Williams JT, Henderson G. (1996) Baclofen inhibition of the hyperpolarization-activated cation current, I_h , in rat substantia nigra zona compacta neurons may be secondary to potassium current activation. *J Neurophysiol.* 76:2262-2270.

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron.* 18:779-791.

Winkler C, Kirik D, Bjöklund A. (2004) Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *TRENDS in neurosciences.* 28: 86-92.

Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA. (2001) Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol.* 29:1361-70.

Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez-Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K. (2006) Subventricular zone-driven neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J neurosci.* 26:6627-6636.

Yoshimizu T, Chaki S. (2004) Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun.*, 315:493-496.

Zainos-Rosales A, Aguilar-Roblero R, Mendoza-Ramírez JL, Drucker-Colín. (1993) 2-Deoxyglucose autoradiographic evidence that substantia nigra grafts in 6-hydroxydopamine lesioned animals produce recovery of motor asymmetries by exerting contralateral effects. *Neurosci. Lett.* 156:99-10.

Zhang LI, Poo MM. (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4 (Suppl): 1207-14.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlén M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisé J, Janson AM. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:7925-7930.

Zhou J, Pliego-Rivero B, Bradford HF, Stern GM. (1996) The BDNF content of postnatal and adult rat brain: the effects of 6-hydroxydopamine lesions. *Dev Brain Res* 97:297-303.

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.*, 11:234-245.