



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Efecto de la administración de nicotina sobre
la neurogénesis en la zona subventricular en
un modelo roedor de la enfermedad de
Parkinson

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:
ANA CLEMENTINA EQUIHUA BENÍTEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO

REVISOR:
DRA. MARTHA ESCOBAR RODRÍGUEZ



2013

Esta tesis se realizó en el laboratorio AL-201 a cargo del Dr. René Drucker Colín en la División de Neurociencias en el Departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. Magdalena Guerra Crespo.

Este proyecto contó además con el apoyo económico de los siguientes programas, sin el cual su realización no hubiera sido posible.

DGAPA-IACOD IA201911 otorgado a la Dra. Magdalena Guerra Crespo,
DGAPA-PAPIIT IB202112 otorgado a la Dra. Magdalena Guerra Crespo,
DGAPA-PAPIIT IN225209 otorgado al Dr. René Drucker Colín,
DGAPA-PAPITT IN204612 otorgado al Dr. René Drucker Colín,
IMPULSA-02 Coordinación de la Investigación Científica.

Frutos de este trabajo han sido distinguidos con los siguientes reconocimientos,

Segundo lugar en el Concurso de Imágenes de Microscopía de Fluorescencia
del Instituto de Fisiología Celular, 2011.

Reconocimiento Honorario de Servicio Social Gustavo Baz Prada,
Facultad de Psicología, UNAM, 2011

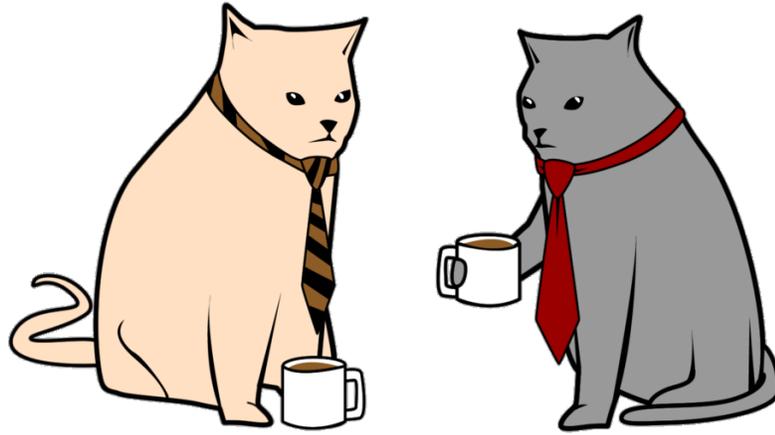
Me gustaría agradecer a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular, Khalil, Kousuke, Omar, Lupita, Mafi, Fer, Moni, Lalo, Pablo, Lino , Tere, Mari y Paco, por ser parte de este increíble equipo y por su invaluable ayuda.

En particular quiero agradecer a Alejandra Boronat por ser mi hermana perdida, al Dr. José Rubén García Montes por tomarme bajo su ala (ranchera) y a Marcela Palomero Rivero y Diana Millán Aldaco por siempre estar dispuestas a enseñarme a hacer cosas nuevas para hacerlas bien.

También agradezco al Dr. René Drucker por permitirme trabajar en su laboratorio todo este tiempo y a la Dra. Magdalena Guerra por ayudarme a escribir esta tesis.

A mi familia y amigos por su paciencia y apoyo incondicional.

¡Gracias!



Con todo el amor,
para mis padres Griselda y Miguel.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	2
Resumen	3
Introducción	4
Capítulo 1: Neurogénesis en el cerebro adulto.....	6
Cambio de dogma	6
Neurogénesis en la zona subventricular	8
Modulación epigenética.....	11
Neurogénesis adulta, ¿para qué?	13
Capítulo 2: Enfermedad de Parkinson	15
Neuropatología.....	15
Tratamiento.....	17
Modelo Murino	18
Neurogénesis en la enfermedad de Parkinson.....	20
Capítulo 3: El papel de la nicotina	22
Nicotina y la enfermedad de Parkinson.....	22
Nicotina y neurogénesis.....	25
Material y método.....	28
Tratamiento agudo de nicotina	28
Tratamiento crónico de nicotina	28
Grupos control.....	29
Cirugía estereotáxica	29
Administración de bromodeoxiuridina	30
Perfusión	30
Corte de cerebros	31
Técnicas histológicas.....	31
Inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa.....	31
Inmunofluorescencia bromodeoxiuridina y doblecortina	32
Conteos	33
Resultados.....	34
Determinación del grado de lesión con 6OHDA.....	34
No hay diferencias entre hemisferios en ninguna de las condiciones.....	36
El tratamiento agudo de nicotina no modifica la neurogénesis de la ZSV.....	37
El tratamiento crónico de nicotina disminuye la proliferación en la ZSV	39
El tratamiento con nicotina indujo diferenciación neuronal	43
Discusión	45
Conclusiones	51
Referencias.....	53

ABREVIATURAS

6OHDA 6-hidroxidopamina	MPTP metilfeniltetrahidropiridina
ACh acetilcolina	NA noradrenalina
BB basal-BrdU	nAChR receptores colinérgicos nicotínicos
BO bulbo olfatorio	NeuN antígeno nuclear neuronal
BrdU bromodeoxiuridina	NA nicotina-A
CC cuerpo caloso	NC nicotina-C
ChAT colina acetiltransferasa	PCNA antígeno nuclear de células en proliferación
DA dopamina	PSA-NCAM molécula de adhesión celular neural polisializada
DAT transportador de DA	SA sham-A
DCX doblecortina	SC sham-C
EGF factor de crecimiento epidérmico	SN <i>substantia nigra</i>
EGFR receptor para EGF	SNc <i>substantia nigra pars compacta</i>
EP enfermedad de Parkinson	SNr <i>substantia nigra pars reticulata</i>
FGF-2 factor de crecimiento de fibroblastos 2	ST estriado
FGF1R y FGF2R receptor tipo 1 y 2 para FGF-2	TH tirosina hidroxilasa
GB ganglios basales	VL ventrículo lateral
GD giro dentado	VO vía oral
GFAP proteína ácida fibrilar glial, por sus siglas en inglés	VRM via rostral migratoria
IP intraperitoneal	ATV area tegmental ventral
L6OHDA lesión-6OHDA	ZSV zona subventricular
LD levodopa	

RESUMEN

La segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente a nivel mundial es la enfermedad de Parkinson (EP). La EP está caracterizada por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) lo que conlleva a una grave disminución en la disponibilidad de dopamina (DA) en los núcleos putamen y caudado, estructuras en contacto con el nicho neurogénico de la zona subventricular (ZSV). Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una correlación inversa entre fumar y el desarrollo de la EP. La nicotina, un ingrediente activo del tabaco, es un agonista no selectivo de receptores nicotínicos del sistema colinérgico cuya estimulación es capaz de liberar en la ZSV al neurotransmisor dopamina (DA) y el factor de crecimiento FGF-2 desde neuronas y glía. En este estudio nos propusimos estudiar el efecto de la administración aguda y crónica de nicotina sobre la neurogénesis de la ZSV en un modelo animal de lesión de la EP. Para ello utilizamos 34 animales divididos en seis grupos, dos control sin tratamiento de nicotina (basal-BrdU y lesión-6OHDA), dos de tratamiento agudo intraperitoneal (nicotina-A y sham-A) y dos de tratamiento crónico vía oral (nicotina-C y sham-C). Nuestros resultados indican que, contrario a nuestra hipótesis, el tratamiento agudo de nicotina no tiene efecto sobre la neurogénesis de la ZSV mientras que el tratamiento crónico la disminuye. Además, de manera interesante, identificamos que la lesión con 6OHDA no tuvo efecto sobre la neurogénesis de la ZSV como se ha reportado en otros modelos de daño de EP, por lo que proponemos explorar otras áreas que podrían estar involucradas en regular la neurogénesis de este nicho, como por ejemplo el área tegmental ventral (ATV).

Palabras clave: Parkinson, neurogénesis, nicotina.

INTRODUCCIÓN

De manera general aún prevalece la noción de que la formación de neuronas, también llamada neurogénesis, es un fenómeno restringido a la etapa del desarrollo embrionario. Sin embargo, hoy en día existe suficiente evidencia que demuestra que este proceso se mantiene vigente a lo largo del ciclo vital de muchos mamíferos, incluyendo a los humanos. Este descubrimiento revolucionó por completo la concepción que se tenía acerca del cerebro en la etapa posnatal y ha abierto el panorama de investigación para introducir nuevas líneas de estudio enfocadas en procesos de regeneración neuronal. La neurogénesis durante la etapa adulta tiene especial relevancia en el campo de las enfermedades neurodegenerativas donde la pérdida celular es específica para poblaciones neuronales en cerebros de personas adultas.

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente a nivel mundial y afecta principalmente a personas mayores de 60 años. El estudio de esta enfermedad ha revelado que algunos síntomas, como pueden ser depresión, problemas cognitivos y disfunción olfativa, tienen su origen en regiones cerebrales íntimamente ligadas a los nichos neurogénicos conocidos, el giro dentado (GD) del hipocampo y la ZSV del ventrículo lateral. Además, en algunos modelos animales de la EP se han descrito alteraciones en la neurogénesis de estos nichos, lo que ha dado origen a la hipótesis de que esto podría ser en parte causa de algunos de los síntomas de la enfermedad.

Aunque no se conocen con claridad las causas que desencadenan los mecanismos degenerativos en la EP, evidencia epidemiológica deja ver una clara correlación inversa entre fumadores crónicos e incidencia de EP, correlación que se hace más fuerte con la cantidad de cajetillas fumadas y el tiempo en años que se lleva fumando, lo que llevaría a suponer una mayor resistencia a la degeneración.

La nicotina es un ingrediente activo del cigarro con capacidad para interactuar con el sistema colinérgico y participar en la regulación de varios procesos, incluyendo la neurogénesis de la ZSV. Esta información hace de la nicotina un interesante tema de estudio tanto en la EP como para la neurogénesis. En este proyecto decidimos explorar

la capacidad de la nicotina para participar en la actividad neurogénica de la ZSV en un modelo animal de la EP. Además, debido a que se sugiere que la disminución en la incidencia de la EP en fumadores está relacionada con el tiempo que se lleva fumando decidimos explorar el efecto de la nicotina a diferentes intervalos de tiempo, utilizando un protocolo agudo y otro crónico.

CAPÍTULO 1:

NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

CAMBIO DE DOGMA

Neurogénesis es el proceso por el cual se forman nuevas neuronas funcionales a partir de células precursoras neurales (Ming & Song, 2005) y es un proceso que involucra la proliferación, migración y diferenciación celular (Hagg, 2005). Las células precursoras neurales tienen la capacidad de ser auto-renovables y multipotentes; dicho de otra manera mantienen una población estable en tamaño a través del proceso de división celular y al mismo tiempo producen células que después de proliferar se diferencian a los diferentes linajes neurales: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas.

Durante la mayor parte del siglo XX la neurogénesis se consideró como un proceso exclusivo de la etapa embrionaria. El dogma predominante, adjudicado a Ramón y Cajal descartaba la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto (Gross, 2000); entre el peso de su autoridad y las limitantes de los métodos disponibles en la época fue difícil que reportes contradiciendo el dogma fueran considerados con seriedad.

La primera evidencia de neurogénesis en el cerebro de un mamífero adulto fue contribución de Joseph Altman, quien reportó el hallazgo de nuevas neuronas al observar núcleos marcados con timidina tritiada (H^3 -timidina) en el cerebro de ratas adultas (Altman, 1962). Específicamente en el GD ubicado en el hipocampo, Altman describió neurogénesis como parte un proceso de apa maduración posnatal (Altman & Das, 1965; Kaplan & Hinds, 1977). Estos estudios fueron ignorados e incluso desestimados por importantes miembros de la comunidad científica contemporánea, como lo hizo en su momento Pasko Rakic (Rakic, 1985).

Eventualmente tres contribuciones científicas permitieron superar el dogma: la demostración de neurogénesis en aves (Paton, O'Loughlin, & Nottebohm, 1985), la incorporación de bromodeuxiuridina (BrdU) en los estudios de neurogénesis (Leif,

Stein, & Zucker, 2004), y el estudio de su regulación por diferentes factores externos e internos (Ma et al., 2010).

Nottebohm estudió en el canario los núcleos conocidos por estar asociados al control del canto. Descubrió que las hembras poseen núcleos más pequeños, posiblemente debido a la ausencia de conducta de canto, mientras que entre machos el tamaño de los núcleos varía de manera proporcional a la complejidad de su repertorio musical. Para Nottebohm, esto parecería indicar que la información aprendida, como son las canciones que canta un canario, requiere de espacio en el cerebro (en forma de tamaño, densidad y complejidad de circuitos) como sucede con libros en una biblioteca (Nottebohm, 1985). Para probar esta hipótesis, canarios hembra fueron sometidas a un tratamiento de testosterona -el canto de los canarios es una conducta dependiente de testosterona- con el objetivo de observar neurogénesis tras el crecimiento de los núcleos asociados al control del canto. Los resultados sorprendieron a todos al mostrar la existencia de neurogénesis incluso en grupos sin tratamiento de testosterona, indicando que su ocurrencia es un proceso constante del sistema nervioso central (Paton et al., 1985).

Para marcar células en división, Nottebohm utilizaba H³-timidina, el método por excelencia de la época. Esta técnica posee dos importantes desventajas que obligaron el desarrollo de métodos alternativos, por una parte el reactivo es radioactivo y por otra su revelado requiere de largos periodos de tiempo (Taupin, 2007). Hoy en día se utiliza bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que es incorporado al núcleo de la célula cuando se está llevando a cabo la síntesis de ADN. Las células marcadas con BrdU pueden ser identificadas mediante técnicas de inmunotinción y observadas al microscopio para su análisis (Leif et al., 2004).

El uso de BrdU facilitó el estudio de la neurogénesis de tal manera que para la década de los noventa ya había múltiples publicaciones que sustentaban los descubrimientos realizados por Altman y los ampliaban al confirmar su existencia en diferentes clases de primates no-humanos (Gould et al., 1999; Gould, Tanapat, McEwen, Flügge, & Fuchs, 1998; Kornack & Rakic, 1999) e incluso en humanos (Eriksson et al., 1998). Además, se comenzaron a publicar trabajos que dejaban entrever la neurogénesis

como un fenómeno modulado de manera constante, posiblemente involucrado en procesos complejos, convirtiéndose así en un fenómeno de gran interés. Por ejemplo, la existencia de neurogénesis en el hipocampo (Altman & Das, 1965), región también descrita por Milner y colaboradores como imprescindible para procesos de aprendizaje y memoria (Scoville & Milner, 1957), no pasó desapercibida y pronto varios grupos comenzaron a estudiar dichas funciones en relación a la tasa neurogénica del GD.

Experimentos diseñados para probar tareas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo fueron realizados a la par de modificar condiciones ambientales para buscar una relación entre neurogénesis y desempeño. Se encontró que las condiciones que inducen proliferación celular en el GD también resultan en un mejor desempeño en las tareas probadas y las que la inhiben tienen el efecto contrario. Entre los factores que la estimulan se encuentran la presencia de estrógeno (Tanapat, Hastings, Reeves, & Gould, 1999), ambientes enriquecidos (Kempermann, Kuhn, & Gage, 1997; Nilsson, Perfilieva, Johansson, Orwar, & Eriksson, 1999; Nottebohm, 1985) y el ejercicio (Van Praag, Christie, Sejnowski, & Gage, 1999); mientras que entre los factores que la inhiben se encuentra el estrés (Cameron & McKay, 1999; Gould & Tanapat, 1999).

La demostración de neurogénesis activa en el cerebro adulto no sólo habla de un sistema nervioso central maduro con capacidades regenerativas antes desconocidas, sino que además permitió el surgimiento de nuevas líneas de investigación enfocadas en reparar el sistema nervioso central de un adulto que ha sufrido una lesión o que padece alguna enfermedad neurodegenerativa (Ming & Song, 2005; Rubin, 2009).

NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR

Aunque desde la década de los sesenta Altman demostró neurogénesis en el GD de la rata adulta (Altman & Das, 1965; Altman, 1962), fue hasta los años noventa cuando se determinó la existencia de un nicho neurogénico en la ZSV de los ventrículos laterales (figura 1) (Lois & Alvarez-Buylla, 1993). La ZSV del roedor es una zona muy estructurada, adyacente a la pared de los ventrículos laterales (figura 2). Recubriendo la pared del ventrículo se encuentran las células endociliares involucradas en la producción y circulación del líquido cefalorraquídeo. Yuxtapuesta a esta capa hay una

zona germinal en donde hay tres tipos de células: astrocitos, precursores inmaduros y neuroblastos migrantes.

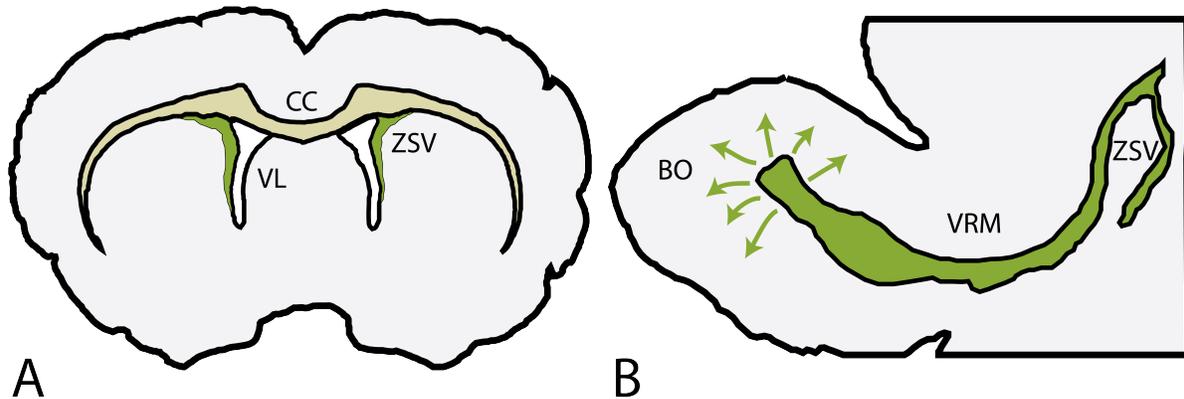


Figura 1 Ubicación de la zona subventricular (ZSV) en el cerebro de la rata. A) Corte coronal donde se observa la ZSV en verde adyacente a los ventrículos laterales (VL) y el cuerpo calloso (CC). B) Corte sagital que muestra la vía rostral migratoria (VRM) su origen en la ZSV y destino final en el bulbo olfatorio (BO).

Las células en contacto directo con las ependimales son un tipo particular de astrocitos conocidos como células tipo B, de las cuales se han identificado dos subtipos: B1 y B2. Cuando las células tipo B se dividen originan a las células tipo C, estas son los precursores inmaduros cuya elevada tasa de división da lugar a los neuroblastos migrantes, conocidos como células tipo A (Doetsch, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1997).

La ultraestructura de las células tipo B es similar a la de los astrocitos derivados de la glía radial (Spassky et al., 2005) con filamentos intermedios que expresan proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y múltiples extensiones que entran en contacto con muchas otras células, por lo que se han propuesto como un tipo especial de astrocito. Estas células se organizan de manera tubular rodeando a las tipo A (García-Verdugo, Doetsch, Wichterle, Lim, & Alvarez-Buylla, 1998). Las células tipo B son consideradas las células troncales de la ZSV (Doetsch, Caillé, Lim, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999; Merkle, Mirzadeh, & Alvarez-Buylla, 2007).

Las células tipo C o células en amplificación, se observan organizadas en cúmulos esporádicos distribuidos de manera discreta exclusivamente a lo largo de la pared del

ventrículo; su división da origen a las células tipo A en la ZSV (Doetsch et al., 1997). Las células tipo A, o neuroblastos migrantes se originan en la ZSV y se organizan en cadenas alineadas tangencialmente a la pared del ventrículo; cuando estas cadenas alcanzan el cuerno del ventrículo se integran en una intrincada red que da lugar a la vía rostral migratoria (VRM). La VRM es el camino de varios milímetros, que recorren los neuroblastos para llegar de la ZSV al BO utilizando un proceso conocido como migración en cadena (Lois, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1996). En el BO los neuroblastos se diferencian en interneuronas periglomerulares o granulares que se integran a circuitos funcionales (Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Winner, Cooper-Kuhn, Aigner, Winkler, & Kuhn, 2002).

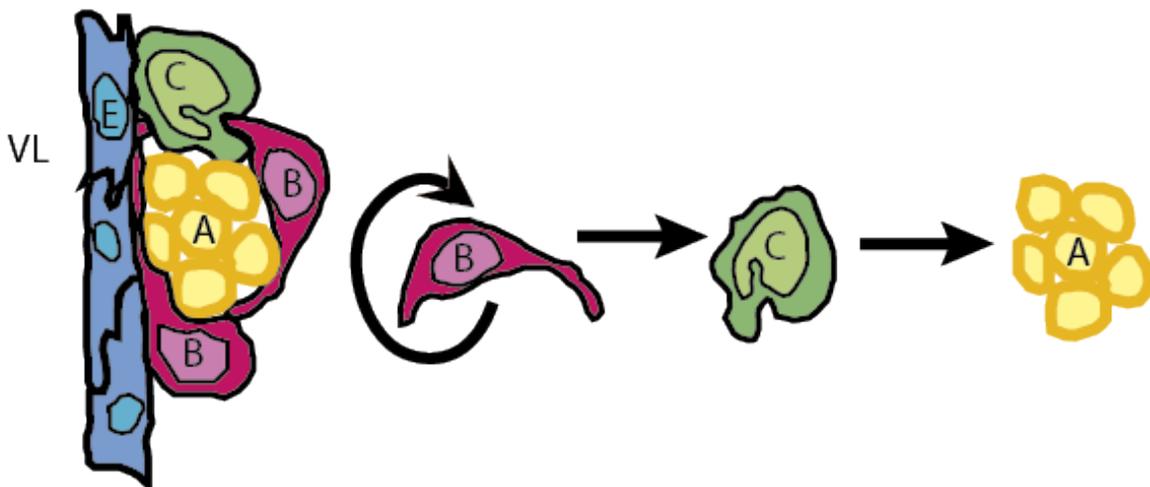


Figura 2 Organización celular de la ZSV. Alineadas a la pared del VL se encuentran las células ependimales (E); en contacto con estas se ubican las células troncales multipotentes de la ZSV, las células tipo B, que envuelven a los neuroblastos migrantes o células tipo A. La división de células tipo B produce a las células tipo C y a su vez, éstas se dividen para dar lugar a su vez a las células tipo A. Imagen tomada y modificada de (García-Verdugo et al., 1998).

El estudio de la composición celular de la ZSV se ha visto beneficiada por el desarrollo de marcadores celulares específicos. Con excepción de las células tipo B y E, las células de la ZSV pueden distinguirse una de otra de manera relativamente sencilla utilizando algunos marcadores específicos (Tabla 1). Existen también marcadores que hacen uso del patrón de expresión temporal de algunas moléculas en la célula. Particularmente en la ZSV, algunos de estos marcadores con sucesión temporal

incluyen la GFAP durante la proliferación; la molécula de adhesión celular neural polisializada (PSA-NCAM) y doblecortina (DCX), durante la migración y diferenciación neuronal temprana; y el antígeno nuclear neuronal (NeuN) expresado en la etapa de diferenciación neuronal terminal, es decir, en las neuronas maduras que llegan al BO (Mullen, Buck, & Smith, 1992).

Tabla 1 Marcadores inmunohistoquímicos para células de la ZSV. Tomado de (García-Verdugo et al., 1998)

	PSA-NCAM	TuJ1	GFAP	Vimentina	Nestina
Tipo A	+++	+++	-	-	+
Tipo B	-	-	++	+	++
Tipo C	-	-	-	-	+
Ependimales	-	-	+	++	+++

MODULACIÓN EPIGENÉTICA

Para mantener el recambio celular en el BO, la ZSV de la rata produce alrededor de 30,000 neuroblastos al día (Lledo, Alonso, & Grubb, 2006; Platel, Stamboulian, Nguyen, & Bordey, 2010). Esta neurogénesis depende de la modulación a través de factores celulares internos como la expresión de genes y de factores externos como factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores. Además, este nicho es regulado por factores ambientales, farmacológicos e incluso procesos patológicos como la enfermedad de Parkinson (EP) (Arias-Carrión, Olivares-Bañuelos, & Drucker-Colín, 2007).

Existen varios factores de crecimiento que influyen en la neurogénesis de la ZSV, entre otros, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) que han sido estudiados y vinculados con un incremento en la proliferación celular (Bath & Lee, 2010; Mudò et al., 2009). Adicionalmente, se ha observado que la disminución en la disponibilidad de los factores de crecimiento, como ocurre con la edad, disminuye la tasa neurogénica (Enwere et al., 2004; Belluardo et al., 2008; Frinchi et al., 2010; Shrueter, Melamed, & Offen, 2010).

El EGF incrementa la proliferación y además induce migración hacia estructuras adyacentes a la ZSV donde la diferenciación es principalmente a glía, oligodendrocitos (Gonzalez-Perez, Romero-Rodriguez, Soriano-Navarro, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2009) y astrocitos (O'Keeffe, Tyers, et al., 2009). Por otro lado, también se determinó que la falta de señalización dependiente de los receptores de EGF (EGFR) impide la migración y formación de nuevos oligodendrocitos en respuesta a una lesión desmielinizante, como la producida por microinyección de lisolecitina (Aguirre & Gallo, 2007).

En la ZSV, el FGF-2 es sintetizado por astrocitos del nicho neurogénico. Además, el incremento en la proliferación de progenitores es mediado por los receptores FGF1R y FGF2R identificados en células tipo C y B, respectivamente (Mudò, Belluardo, Mauro, & Fuxe, 2007). La estimulación de estos receptores aumenta el número de células diferenciadas a neuronas (Mudò et al., 2009).

Los neurotransmisores también influyen en la neurogénesis de la ZSV, entre los que destacan el ácido gamma-aminobutírico (Gascon et al., 2006), el glutamato (Platel et al., 2010), la serotonina (Gould & Gross, 2002) y la DA (O'Keeffe, Barker, & Caldwell, 2009; O'Keeffe, Tyers, et al., 2009; Van Kampen, Hagg, & Robertson, 2004).

La catecolamina DA entra en contacto con las células de la ZSV al ser liberada por fibras que proyectan desde la SNc. En la ZSV la DA ejerce su actividad por medio de dos familias de receptores los tipo D1 (D1 y D5) cuya activación es estimulante, y los tipo D2 (D2, D3 y D4) con propiedades inhibitorias (Rice, Patel, & Cragg, 2011). La distribución de receptores dopaminérgicos en las células de la ZSV no es homogénea, mientras que no han podido identificarse receptores en las células tipo B, las tipo A presentan receptores de la familia D1, y en las tipo C se han observado de ambas familias, con abundancia de los tipo D2 (Höglinger et al., 2004). La estimulación de receptores tipo D2, y particularmente del D3R, se asocia con incrementos en la proliferación (Coronas et al., 2004; Y. Kim et al., 2010).

Es interesante notar que los eventos que ocasionan alteraciones en la neurotransmisión del sistema nervioso central, como ocurre con las enfermedades

neurodegenerativas, tienen efectos significativos sobre la neurogénesis. Tal es el caso de la EP, en donde la vía de neurotransmisión comprometida es la dopaminérgica.

NEUROGÉNESIS ADULTA, ¿PARA QUÉ?

Es evidente que una gran cantidad de factores forman parte del proceso de neurogénesis en la ZSV, desde la proliferación hasta la diferenciación e integración en el BO. La interrogante de por qué se ha conservado esta capacidad en el cerebro adulto, es decir su relevancia funcional, aún permanece sin respuesta. En el roedor, debido al destino de la VRM en el BO, el primer papel que se consideró importante para las neuronas nacidas en la ZSV está relacionado a la conducta olfativa. Estudios en ratas detallan que la exposición prolongada a ambientes ricos en estímulos olfativos favorecen la supervivencia de células que se integran a las capas granular y glomerular del BO (Rochefort, Gheusi, Vincent, & Lledo, 2002; Rochefort & Lledo, 2005). De manera inversa el confinamiento a ambientes pobres inhibe estos procesos (Alonso et al., 2008; Cavallin, Powell, Biju, & Fadool, 2010).

La conducta olfativa va más allá de la exposición pasiva a odorantes al estar altamente relacionada con la experiencia. En tareas de discriminación existe evidencia de que la práctica mejora el desempeño (Mandairon & Linster, 2009), sin embargo, el papel de la neurogénesis en esta conducta sigue siendo tema de debate. Algunos estudios sostienen que una regulada adición y eliminación de neuronas es indispensable para un óptimo procesamiento de la información olfativa, e incluso que más neuronas integradas al BO beneficia el aprendizaje y discriminación (Moreno et al., 2009; Mouret, Lepousez, Gras, Gabellec, & Lledo, 2009). Otros aseveran que la interrupción del flujo de nuevas neuronas al BO no afecta la conducta de discriminación olfatoria (Kim et al., 2007; Sakamoto et al., 2011).

Otro aspecto en el cual la conducta olfativa juega un papel importante es dentro de la socialización. La interacción entre individuos requiere del sistema olfatorio el cual está equipado para interpretar señales químicas liberadas por diferentes animales, entre estos destacan las feromonas, que son mensajes destinados a individuos de la misma

especie cuyo objetivo es desencadenar una reacción, como la conducta agresiva, sexual o maternal (Tirindelli, Dibattista, Pifferi, & Menini, 2009).

La conducta maternal está íntimamente relacionada con la gestación, un periodo de intensos cambios fisiológicos y hormonales. Estudios han identificado que durante la gestación incrementa la proliferación en la ZSV, efecto mediado por la hormona prolactina (Shingo et al., 2003). Al evaluar ratas con crías se encontró que la proliferación inducida por prolactina es necesaria para el desencadenamiento de la conducta maternal normal, ya que al administrarse un inhibidor de mitosis ésta se vio afectada (Larsen & Gratten, 2012). Aún así, la controversia continúa debido a que una tasa de proliferación y conducta maternal similares pueden ser inducidos en ratas nulíparas sin la presencia de cambios en los niveles de prolactina. Cuando ratas nulíparas tienen a su cuidado neonatos huérfanos, estas manifiestan conducta maternal como lo es reunir a las crías en el nido y protegerlas del frío (Furuta & Bridges, 2009). La causa de este incremento, y su importancia para la conducta maternal mostrada, aún no es clara.

CAPÍTULO 2:

ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP, descrita por primera vez en 1817 en el documento “*An Essay of the Shaking Palsy*” de James Parkinson (Parkinson, 1817), afecta a millones de personas en el mundo siendo los más susceptibles a desarrollarla adultos mayores de 60 años. La OMS estima que hay alrededor de 6 millones de personas viviendo con la enfermedad y para el año 2030 esta cifra podría duplicarse. En México, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) afirma que 50 de cada 100,000 habitantes la padecen.

La EP es crónica y de progresión lenta, la zona del cerebro afectada es la encargada del control y coordinación del movimiento, tono muscular y postura (Toulouse & Sullivan, 2008). Los síntomas clásicos que la identifican son principalmente motores, conocidos como parkinsonismos: temblor en reposo, bradicinesia (enlentecimiento de los movimientos), rigidez (incremento en el tono muscular) e inestabilidad postural (Thomas & Beal, 2007). Otros síntomas motores son acinesia (dificultad para el movimiento) e hipocinesia (reducción en la amplitud de los movimientos) (Galicia, 2006). Existen además síntomas no motores, que preceden a los motores, como alteraciones en el olfato (Tissingh, Berendse, & Bergmans, 2001), alteraciones en la memoria espacial (Pillon et al., 1997) y depresión (Lieberman, 2006).

NEUROPATOLOGÍA

La EP se caracteriza por la progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc. La SNc y sus proyecciones al estriado (núcleos caudado y putamen) conforman la vía nigroestriatal (Bahena-Trujillo, Flores, & Arias-Montaño, 2000). Los síntomas motores que se utilizan para diagnosticar la EP surgen cuando el paciente ha perdido alrededor del 50% de neuronas dopaminérgicas de la SNc y alrededor del 80% de DA en el estriado (Toulouse & Sullivan, 2008) por lo que se considera un diagnóstico tardío de la enfermedad.

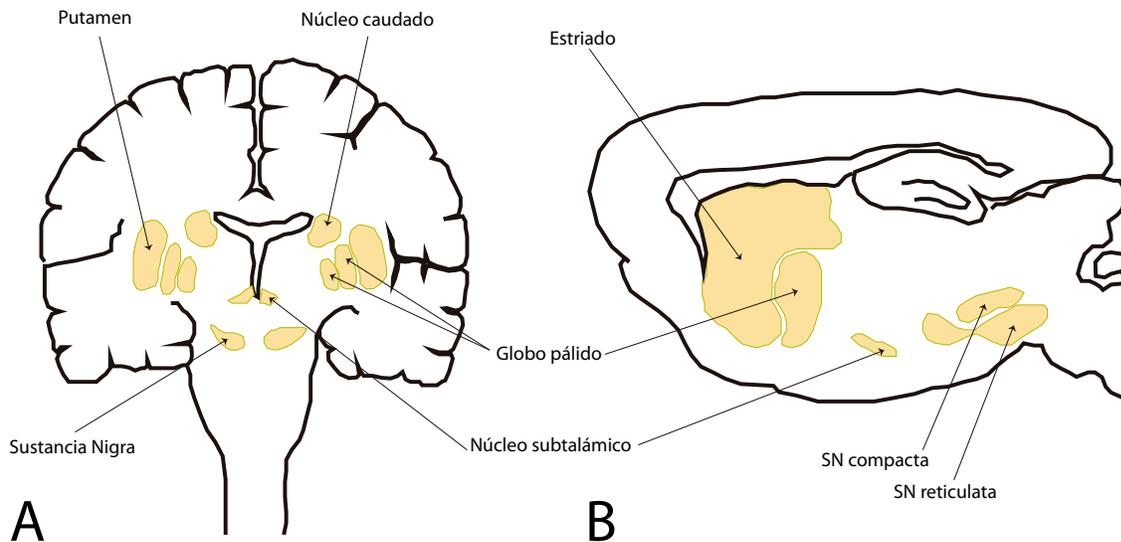


Figura 3 Ganglios basales (GB) en el cerebro de humano y rata. A) El cerebro humano y la distribución de los núcleos que conforman los GB en un corte coronal. B) El cerebro roedor y la distribución de los núcleos que conforman los GB en un corte sagital. En el roedor los núcleos caudado y putamen se agrupan para dar lugar al estriado, también se observa la distinción entre la *substantia nigra pars compacta* (SNc) y *pars reticulata* (SNr).

El estriado y la *substantia nigra* (SN) (*pars compacta* y *pars reticulata*), junto con el globo pálido (interno y externo) y el núcleo subtalámico pertenecen a un conjunto de núcleos conocidos como ganglios basales (GB) involucrados en el control del movimiento voluntario (figura 3). Estos núcleos no se encargan de iniciar el movimiento, sin embargo sí están involucrados en su ejecución, facilitando e inhibiendo los ajustes necesarios para el mejor desempeño. La hipótesis más fuerte sostiene que la modulación óptima del movimiento se logra con ayuda de la estimulación dopaminérgica en el estriado; ésta funciona como un reforzador al liberarse tras la obtención de una recompensa inesperada (Rice et al., 2011; Rothwell, 2011), por lo que sólo ajustes que inesperadamente resulten en una mejor ejecución serán reforzados con liberación de DA.

La causa de la neurodegeneración característica de la EP aún no ha logrado ser identificada con precisión, entre los mecanismos estudiados se encuentran estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, neuroinflamación y la acumulación de proteínas, como α -sinucleína que a su vez forman los cuerpos de Lewy, signo patognomónico de la EP (Dauer & Przedborski, 2003). Aproximadamente un 5% de los casos se pueden

explicar por mutaciones genéticas y hay al menos cinco genes para los cuáles estos mecanismos han sido elucidados: PARK1, 2, 6, 7 y 8 (Lotharius & Brundin, 2002; Thomas & Beal, 2007). La etiología del resto de los casos, los idiopáticos, permanece como un tema intenso de investigación, algunos investigadores han encontrado relación con factores ambientales incluyendo exposición a pesticidas, como rotenona, y el uso de drogas con compuestos tóxicos para el sistema dopaminérgico, como la *metilfeniltetrahidropiridina* (MPTP) (Giasson & Lee, 2000; Langston, Ballard, Tetrud, & Irwin, 1983), reactivos que posiblemente actúan también mediante estrés oxidativo e impidiendo la función mitocondrial (Blesa, Phani, Jackson-Lewis, & Przedborski, 2012).

TRATAMIENTO

Todos los tratamientos utilizados actualmente son útiles para controlar la sintomatología de la enfermedad, sin embargo no detienen su curso. El primer tratamiento para la EP fue un antagonista colinérgico utilizado por Jean Charcot (Aosaki, Miura, Suzuki, Nishimura, & Masuda, 2010) que actúa inhibiendo el movimiento para así disminuir los síntomas motores. Posteriormente, al conocerse la amplia degeneración del sistema dopaminérgico, los esfuerzos se enfocaron en desarrollar tratamientos farmacológicos basados en facilitar la disponibilidad de DA.

Después de cuarenta años de uso clínico, un precursor de DA, la levodopa (LD) es el tratamiento más efectivo para tratar los síntomas de la EP y el más ampliamente utilizado por ser el mejor tolerado por los pacientes (Poewe, Antonini, Zijlmans, Burkhard, & Vingerhoets, 2010). A pesar de ser un fármaco que aminora significativamente los síntomas de la EP, su uso prolongado y las altas dosis requeridas para lograr el efecto terapéutico conforme progresa la EP, genera en los pacientes complicaciones motoras como los movimientos erráticos e involuntarios conocidos como discinesias. Las molestias asociadas al desarrollo de discinesias pueden llegar al extremo de sobrepasar los síntomas de la misma EP, por lo que se puede optar incluso por cesar la administración de LD (Buck & Ferger, 2010). Para postergar al máximo los efectos secundarios desagradables asociados al tratamiento con LD, se suele comenzar administrando agonistas dopaminérgicos. Si bien los

agonistas dopaminérgicos presentan un efecto terapéutico más limitado, poseen la ventaja de no contribuir con el desarrollo de discinesias y permiten posponer el inicio de la administración de LD, incrementando el tiempo de terapia efectiva para el paciente.

Lamentablemente, todos los tratamientos actuales pierden su eficacia con el progreso de la enfermedad. Por ello, la investigación para alcanzar mejores estrategias terapéuticas continua explorando el posible uso de otros fármacos como son los agonistas de receptores nicotínicos, que podrían estar involucrados en mejorar la transmisión dopaminérgica en el estriado (Quik, O'Leary, & Tanner, 2008).

MODELO MURINO

El modelo más ampliamente utilizado para estudiar la EP consiste en ocasionar lesiones unilaterales con una neurotoxina llamada 6-hidroxidopamina (6OHDA) en ratas y ratones (Ungerstedt, 1968). Esta toxina, con estructura análoga a la de las catecolaminas DA y noradrenalina (NA), entra a la célula vía los transportadores de DA (DAT, por sus siglas en inglés) y NA (Simola, Morelli, & Carta, 2007) induciendo estrés oxidativo (Cadet & Brannock, 1997) y alteraciones en la función mitocondrial que culminan en muerte celular (Glinka & Youdim, 1995). Para ocasionar depleción de DA en el estriado, la región de inyección puede variar de acuerdo a las necesidades del estudio, entre las más utilizadas están la SNc, el estriado y el haz de fibras dopaminérgicas, que incluye a las proyecciones de la SNc y del área tegmental ventral (ATV) (Ichitani, Okamura, Matsumoto, Nagatsu, & Ibata, 1991).

La lesión unilateral con 6OHDA ocasiona en el roedor alteraciones motoras susceptibles a ser evaluadas que asemejan la sintomatología de los pacientes con EP (Deumens, Blokland, & Prickaerts, 2002), algunas de estas pruebas y su objetivo de estudio se encuentran resumidas en la tabla 2. Una de las evaluaciones más practicadas consiste en la inyección de un compuesto capaz de activar el sistema dopaminérgico en un animal lesionado con 6OHDA lo cual ocasiona conductas estereotipadas de giros completos sobre el eje. La dirección en que gira el cuerpo del roedor depende del tipo de compuesto que se utilice, mientras la amfetamina provoca giros contralaterales a la lesión, los inducidos por apomorfina son ipsilaterales (Gerfen,

2003; Kahlig et al., 2005). El número de giros evocados se utiliza ampliamente para evaluar el potencial terapéutico de nuevos fármacos tras haberse establecido que la capacidad de un compuesto para inducir giros contralaterales o potenciar el efecto provocado por otros fármacos correlaciona directamente con su potencial terapéutico (Jiang et al., 1993).

Existen además otras pruebas conductuales como son la evaluación de tiempos de reacción, prueba de retiro de extremidades, de la escalera y de palanqueo, evaluación de temblores de mandíbula y ejecución del laberinto de agua de Morris (Simola et al., 2007); e incluso es posible realizar la evaluación de conductas motoras involuntarias inducidas por administración crónica de LD, las cuales recuerdan a las discinesias que se observan en pacientes humanos (Cenci, Lee, & Björklund, 1998).

Tabla 2 Pruebas utilizadas para evaluar el modelo de 6OHDA en roedores

Prueba	Síntoma estudiado	Método
Tiempos de reacción	Iniciación de movimiento	Ratas lesionadas son entrenadas para palanquear con el objetivo de recibir una recompensa tras la presentación de un estímulo visual
Retiro de extremidades	Akinesia	La rata lesionada es colocada en una base que tiene cuatro hoyuelos donde entran las extremidades. Se mide el tiempo que le toma al animal retirar las extremidades
De la escalera	Control motor fino	En un contenedor angosto se colocan pellets azucarados que la rata lesionada puede alcanzar sólo haciendo uso de sus extremidades delanteras. Se evalúa el número de pellets que puede consumir en el tiempo que dura la prueba
De la viga	Coordinación motriz	Los animales deben ascender por una viga angosta y elevada, hasta un compartimento
Laberinto de agua de Morris	Cognición y funciones sensoriomotores	En un tanque redondo con agua lechosa hay una plataforma por debajo del nivel del agua. Se mide el tiempo que pasa el animal nadando y el número de errores que comete antes de encontrar la plataforma

A pesar de ser ampliamente utilizado en la investigación, el modelo de 6OHDA también posee desventajas. Por ejemplo, la denervación dopaminérgica lograda mediante la 6OHDA no emula la pérdida gradual que se observa en pacientes con EP, por lo que

no es posible observar la progresión de la enfermedad. El modelo también carece de aspectos fundamentales de la EP, como es la presencia de cuerpos de Lewy y además se acostumbra realizar lesiones unilaterales, lo cual no emula lo que sucede en la progresión normal de la EP.

En suma, el modelo 6OHDA es relativamente fácil de reproducir y con flexibilidad en cuanto a la evaluación motora, por lo que a pesar de sus limitantes es ampliamente utilizado para el estudio de las disfunciones celulares de la EP y en la búsqueda por nuevos y mejores tratamientos.

NEUROGÉNESIS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La neurogénesis en presencia de estimulación dopaminérgica ha sido muy estudiada en el marco del desarrollo embrionario, determinándose que existe una amplia presencia de receptores dopaminérgicos en los sitios germinales neuroepiteliales activos durante el desarrollo cerebral (Diaz et al., 1997). Una vez que la ZSV, zona rica en DA, fue establecida como un nicho neurogénico del cerebro posnatal los estudios relacionados con la EP comenzaron a surgir.

En la EP, la degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal tiene repercusiones en el funcionamiento del nicho neurogénico de la ZSV. Se ha observado que en ratones adultos lesionados con MPTP hay una disminución en la proliferación dentro de la ZSV, esta disminución es transitoria al igual que este tipo particular de lesión (Höglinger et al., 2004). El mecanismo que subyace parece ser la falta de estimulación dopaminérgica en células tipo C. Esto debido a que se ha mostrado que las fibras dopaminérgicas provenientes de la SN que llegan a la ZSV, entran en contacto con células tipo C y B que expresan receptores para EGF. Las células tipo C, a diferencia de las células tipo B, expresan además receptores dopaminérgicos, incluidos los receptores de la familia D2 cuya estimulación se asocia con incrementos en la proliferación (Höglinger et al., 2004; O'Keeffe, Tyers, et al., 2009). Por ello, se estima que la denervación dopaminérgica afecta la proliferación de células tipo C lo que a su vez reduce la generación de las células tipo A. De esta manera, la DA podría estar actuando de dos formas, de manera directa sobre los receptores tipo D2 y de manera

indirecta sobre los EGFR al estimular la liberación de EGF (O'Keeffe, Barker, & Caldwell, 2009; O'Keeffe, Tyers, et al., 2009).

También se ha documentado que la lesión con 6OHDA ocasiona una disminución significativa y transitoria en el número de células que llegan al BO, cambio que deja de ser significativo a las seis semanas. Interesantemente, en este caso, se observa un incremento en la proporción de células que se comprometen al linaje dopaminérgico, indicado por el número de células que expresan Pax-6 al comienzo de la migración. Al llegar al BO ocurre la migración tangencial hacia las capas granular y glomerular. En la capa granular no se observaron cambios significativos en la proporción de células que se diferenciaron a neuronas, en cambio, en la capa glomerular incrementó el número de células positivas para marcadores neuronales y en particular se triplicó el número total de células comprometidas al linaje dopaminérgico (Winner et al., 2006).

Por otra parte, en un estudio realizado con una lesión inducida por MPTP en ratones se observó que la administración intraperitoneal de FGF-2 modificó la proliferación a nivel de la ZSV provocando un incremento significativo en la proporción de células positivas para el marcador de neuroblastos DCX (Peng, Xie, Jin, Greenberg, & Andersen, 2008). La nicotina, uno de los ingredientes activos del cigarro, es capaz de activar el mecanismo neurogénico de la vía de señalización FGF-2/FGFR-1 (Mudò et al., 2007), promoviendo así la proliferación de células tipo C y el número de células que llegan al BO (Belluardo et al., 1999).

CAPÍTULO 3:

EL PAPEL DE LA NICOTINA

NICOTINA Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La nicotina ha sido objeto de curiosidad en el estudio de la EP debido a la acumulación de evidencia epidemiológica que muestra la relación inversa entre tabaquismo y EP (Baron, 1996; Hernán et al., 2001; Hernán, Takkouche, Caamaño-Isorna, & Gestal-Otero, 2002; Wilk & Lash, 2007). Esto parece paradójico considerando la gran cantidad de consecuencias negativas que el hábito de fumar tiene sobre la salud; sin embargo, de acuerdo a la información acumulada, la incidencia de EP disminuye al incrementar la cantidad de años y cigarros fumados. Este beneficio colateral podría deberse a la acción de la nicotina sobre receptores colinérgicos para facilitar la liberación de DA (Visanji, Mitchell, O'Neill, & Duty, 2006).

La acetilcolina (ACh) es uno de los neurotransmisores más antiguos filogenéticamente hablando y el primer neurotransmisor descubierto (Dale, 1914). La ACh tiene una amplia distribución tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, y está involucrada en muchos procesos vitales como son control del movimiento, aprendizaje y memoria, atención, procesamiento del dolor y el ciclo vigilia-sueño (McCarley, 2007; Picciotto, Higley, & Mineur, 2012).

La ACh es sintetizada por una enzima llamada colina acetiltransferasa (ChAT) a partir de dos componentes, *acetato* y *colina*, en las neuronas colinérgicas. Una vez sintetizada, la ACh puede ejercer su mecanismo de acción al unirse a alguno de los dos tipos de receptores colinérgicos que hay, los metabotrópicos muscarínicos y los ionotrópicos nicotínicos (nAChR). Cada receptor recibe su nombre por el componente exógeno que los estimula específicamente, muscarina y nicotina.

Los nAChR son una familia de canales iónicos sensibles a ligando conformada por cinco subunidades organizados alrededor de un poro permeable a cationes. Las subunidades pueden ser α ($\alpha 2 - \alpha 10$) o β ($\beta 2 - \beta 4$). Los receptores funcionales

dependen de la combinación correcta de subunidades, y pueden estar formados de repeticiones de la misma subunidad α ($\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$) o resultado de combinaciones de diferentes subunidades α ó α y β ($\alpha 7\alpha 8$, $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, entre otros) (Gotti & Clementi, 2004; Gotti, Zoli, & Clementi, 2006). En particular, los nAChR participan en la regulación de una gran cantidad de procesos, como son liberación de neurotransmisor, expresión de genes, plasticidad y memoria, recompensa y dependencia, neuroprotección y muerte celular (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004).

Como se observa en la figura 4, los nAChR se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, por lo cual existe una amplia transposición entre el sistema colinérgico y el sistema dopaminérgico, incluyendo a la SN y el estriado (Belluardo, Mudò, Blum, & Fuxe, 2000; Gotti et al., 2006; Quik et al., 2009). En el estriado existen nAChR donde funcionan como reguladores de la liberación del neurotransmisor DA (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004), principalmente debido a su ubicación presináptica. Entre los nAChR descritos en el estriado están los conformados por el subtipo $\alpha 7$, y los ubicados en terminales dopaminérgicas $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 6\beta 2$ (Gotti & Clementi, 2004; Quik et al., 2009).

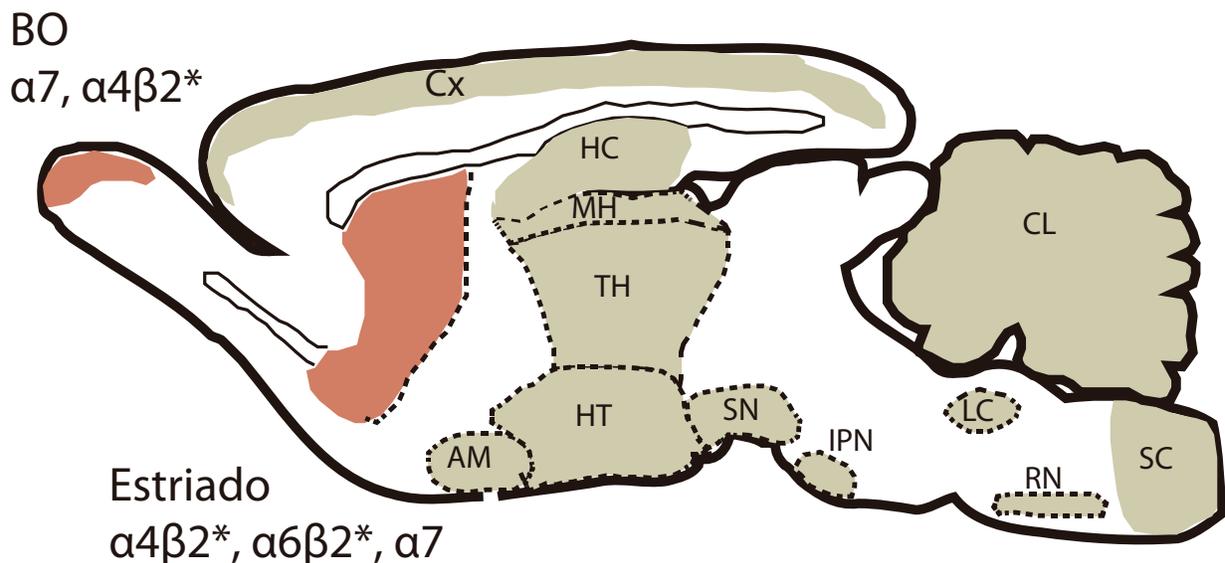


Figura 4 Corte sagital de cerebro de ratona que muestra la amplia distribución de los nAChR en el sistema nervioso central. En rosa se muestran las zonas correspondientes al bulbo olfatorio (BO) y estriado y los respectivos subtipos de nAChR identificados. Además hay nAChR en corteza (Cx), hipocampo (HC), amígdala (AM), tálamo (TH), hipotálamo (HT), *substantia nigra* (SN), cerebelo (CL), locus coeruleus

(LC), núcleos de rafé (RN), entre otros. Los asteriscos (*) denotan receptores cuya conformación no se limita a combinaciones de las dos subunidades indicadas, las tres subunidades restantes pueden ser diferentes.

Mayor evidencia de la íntima relación entre estos sistemas de transmisión surge a partir del estado de los nAChR tras lesiones en la SN. Por ejemplo, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN ocasiona una disminución en el número de receptores nicotínicos en el estriado, las conformaciones más sensibles corresponden a los receptores $\alpha 6\beta 2$. Daños muy severos afectan incluso a los $\alpha 4\beta 2$, pero no a los $\alpha 7$ enfatizando la ubicación en terminales dopaminérgicas de los primeros (Bordia, Grady, McIntosh, & Quik, 2007; Perez, Bordia, McIntosh, & Quik, 2010). Por otro lado, la exposición crónica a nicotina incrementa la densidad de nAChR, particularmente de $\alpha 4\beta 2$. (Perry et al., 2007; Xiao et al., 2009)

La estrecha relación entre el sistema colinérgico y dopaminérgico ha ocasionado que actualmente se estudie el potencial terapéutico que la nicotina pudiera tener para la EP. Estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, mantienen un debate al respecto del posible papel neuroprotector de la nicotina contra lesiones dopaminérgicas inducidas por neurotoxinas (para más información ver: Quik et al., 2009; Quik, Perez, & Bordia, 2012; Seidl & Potashkin, 2011). Algunos estudios en animales lesionados con 6OHDA, encontraron que la nicotina disminuye el grado de lesión dependiendo de la dosis administrada y además observan que este efecto no se logra al realizarse el estudio en animales que carecen de la subunidad $\alpha 4$ específica de nAChR (Ryan, Ross, Drago, & Loiacono, 2001). Otro grupo además sostiene, que uno de los mecanismos del efecto neuroprotector de la nicotina está mediado por su acción antiinflamatoria de acuerdo a sus estudios realizados en modelos animales de MPTP y 6OHDA de la EP (Park et al., 2007). En general se considera que la nicotina puede ayudar a proteger contra el daño a neuronas pero no revertirlo.

Otro potencial enfoque para la terapia basada en nicotina involucra usarla en conjunto con la terapia tradicional de sustitución dopaminérgica. Sabemos que el uso prolongado de LD conlleva en la gran mayoría de los pacientes al desarrollo de efectos secundarios indeseables, como son las discinesias. Estudios en ratas y primates no-humanos muestran que la administración conjunta con nicotina ayuda a disminuir la

cantidad de discinesias presentadas (Quik et al., 2007; Bordia, Campos, McIntosh, & Quik, 2010; Buck & Ferger, 2010; Huang, Campos, Ly, Ivy Carroll, & Quik, 2011).

NICOTINA Y NEUROGÉNESIS

De acuerdo a la evidencia disponible, queda claro que la nicotina es un compuesto con gran potencial para interactuar con el sistema nervioso. Dentro del contexto de la EP hemos visto que particularmente los nAChR de subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 6\beta 2$ se ubican en el estriado en terminales dopaminérgicas provenientes de la SNc, donde representan alrededor del 90% (70% y 20% respectivamente) de los nAChR disponibles (Gotti & Clementi, 2004), lo que los hace relevantes en el estudio de la neurogénesis en la ZSV. La capacidad de los nAChR de modular la neurogénesis puede en parte explicarse por su potencial como mediador de la liberación de DA y FGF-2.

La liberación de DA es regulada por los nAChR debido a su ubicación principalmente presináptica en las terminales dopaminérgicas. Experimentalmente se ha demostrado que la inyección focalizada de nicotina en el estriado estimula la liberación de DA y a su vez en administraciones sistémicas la liberación dopaminérgica inducida depende de la dosis administrada (Visanji et al., 2006). Al ser capaz de inducir la liberación de DA directamente en la ZSV, la nicotina es un potencial regulador de la neurogénesis mediada por DA. Recordemos que este efecto está mediado por las células tipo C, las cuales presentan una gran cantidad de receptores de la familia D2, en donde la estimulación dopaminérgica promueve la proliferación en este nicho neurogénico. En particular la activación de D3R induce un incremento significativo de la proliferación y del número de células comprometidas al fenotipo neural (Van Kampen et al., 2004).

La DA tiene un segundo mecanismo de acción sobre la neurogénesis de la ZSV al promover la liberación de EGF (O'Keeffe, Tyers, et al., 2009), que junto con el FGF-2, ha sido estudiado por su capacidad de incrementar la proliferación en la ZSV. La infusión ventricular de EGF incrementó sustancialmente el número de células producidas en la ZSV, con la importante característica de aumentar el número de células con fenotipo glial (Kuhn, Winkler, Kempermann, Thal, & Gage, 1997).

Coincidentemente, las células que expresan los receptores para EGF son las células tipo C (Doetsch, Petreanu, Caillé, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2002).

Resumiendo, la nicotina podría regular la liberación DA en la ZSV, la cual a su vez puede actuar de manera directa sobre receptores tipo D2 y de manera indirecta al liberar EGF que actúa sobre los EGFR, ambos receptores localizados en células tipo C (O'Keeffe, Barker, & Caldwell, 2009; O'Keeffe, Tyers, et al., 2009).

Por otro lado, hay evidencia que confirma que el FGF-2 tiene un papel activo en la regulación de la neurogénesis de la ZSV. El FGF-2 es un factor de crecimiento sintetizado y liberado principalmente por astrocitos del nicho neurogénico (Reuss & Von Bohlen und Halbach, 2003). En estudios realizados con infusión intraventricular de FGF-2 se observó un incremento significativo del número de nuevas células producidas a nivel de ZSV y de células diferenciadas a neuronas a nivel de BO, en comparación con un grupo sometido a infusión de líquido cefalorraquídeo (Kuhn et al., 1997). La administración de un agonista específico para el nAChR $\alpha 4\beta 2$ demostró que FGF-2 se libera de manera dosis-dependiente en varias regiones del cerebro incluyendo el hipocampo, SN, estriado y corteza frontal (Belluardo et al., 1999).

En la ZSV, el tratamiento agudo con nicotina intraperitoneal ha mostrado ser capaz de promover la neurogénesis al inducir la liberación de FGF-2; este efecto está mediado por la activación de FGFR-1 expresados en las células tipo C y el sucesivo incremento de esta población de células (Mudò et al., 2007). Este incremento en la proliferación de precursores celulares se mantuvo significativo hasta 72 horas posterior al tratamiento (Belluardo et al., 2008; Mudò et al., 2009).

En síntesis, la nicotina es un potente moderador de la liberación de moléculas en el sistema nervioso central. Dentro de la ZSV la acción proliferativa de la nicotina depende de su capacidad de liberar los ligandos específicos de los receptores localizados en células tipo C. La evidencia documenta que la nicotina es capaz de modular directamente la neurogénesis vía DA y FGF-2 e indirectamente la mediada por EGF. En la figura 5 se resumen estos mecanismos de acción.

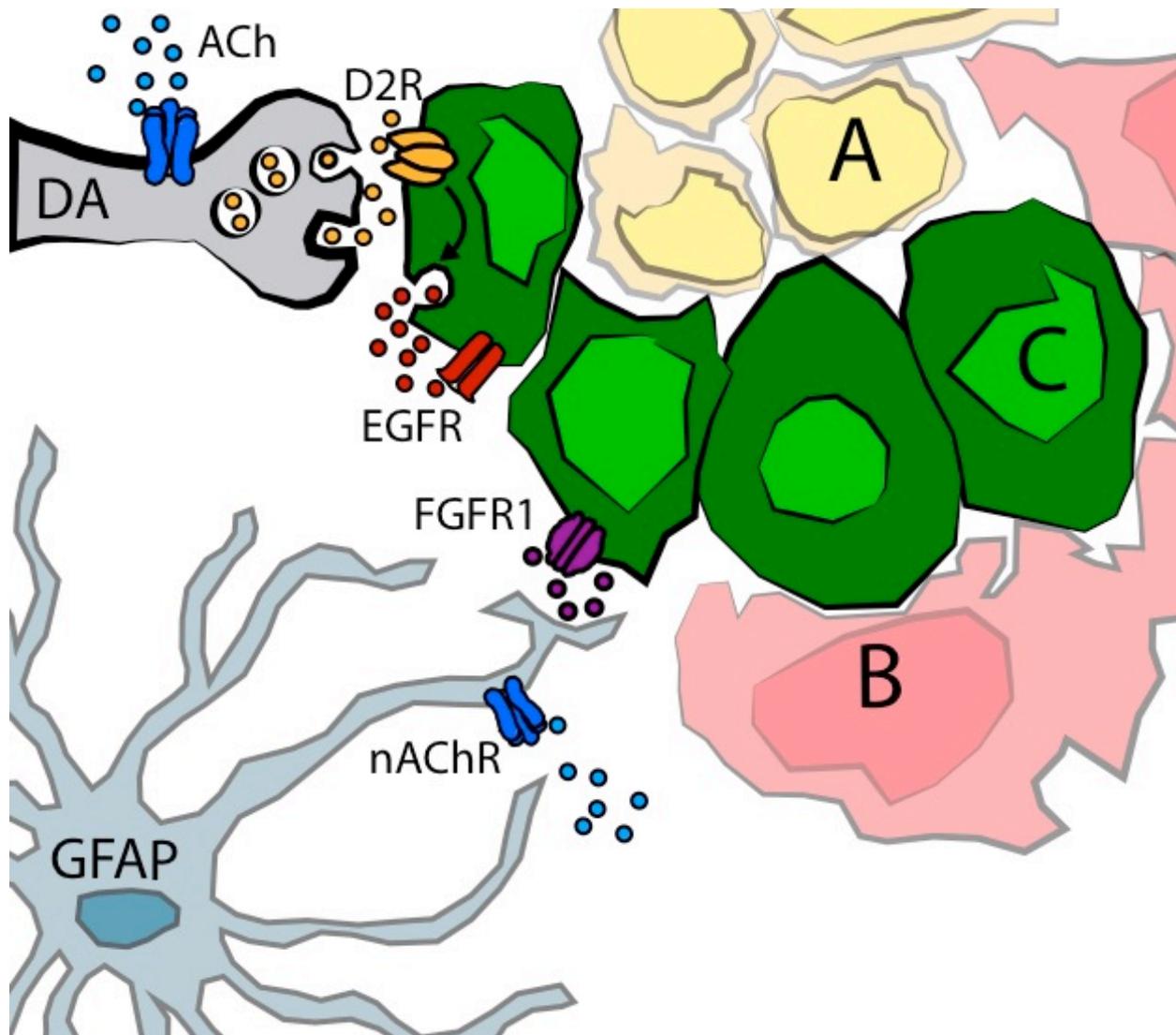


Figura 5 Modulación colinérgica de la proliferación en la ZSV. La activación de receptores nicotínicos (nAChR) estimula la liberación del neurotransmisor DA desde terminales dopaminérgicas y del factor de crecimiento FGF-2 desde glía (astrocitos GFAP+) debido a su ubicación presináptica. Estas moléculas a su vez activan sus respectivos receptores (D2R y FGFR-1) en células tipo C, promoviendo así la proliferación. La DA, además, ocasiona la liberación de otro factor de crecimiento, EGF, el cual activa receptores EGFR en células tipo C, estimulando también la proliferación.

Considerando la capacidad de la nicotina para interactuar con el sistema colinérgico y liberar neurotransmisores como es la DA, previamente relacionados con inducir incrementos en la proliferación, el objetivo principal de este trabajo fue determinar si la nicotina posee capacidad moduladora sobre la neurogénesis en la ZSV en condiciones de daño a la SNc producido a través de 6OHDA. Con el fin de explorar cambios temporales en la capacidad de la nicotina para actuar sobre la neurogénesis de la ZSV, utilizamos dos esquemas de administración, uno agudo y otro crónico.

MATERIAL Y MÉTODO

Todos los experimentos están acorde con las normas de cuidado del Comité de Bioética y Cuidado de Animales Experimentales del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TRATAMIENTO AGUDO DE NICOTINA

Se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso promedio de 250 g al momento de ingresar al *vivarium*. Las ratas fueron alojadas en cajas jumbo, cinco en cada una, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a alimento y agua. Los animales fueron organizados en los siguientes grupos:

- Nicotina-A: Lesión con 6OHDA en la SNc y administración IP de nicotina durante un día.
- Sham-A: Lesión simulada con inyección de solución salina en la SNc y administración IP de nicotina durante un día.

La administración aguda comenzó al octavo día posterior a la cirugía estereotáxica (Winner et al., 2006). Los grupos Nicotina-A y Sham-A recibieron cuatro inyecciones de nicotina (Sigma-Aldrich) IP, concentración de 1 mg/Kg/mL, a intervalos de 30 min (Mudò et al., 2007). La solución de nicotina fue filtrada y su pH ajustado a 7.4 previo a ser inyectado.

Todos los grupos recibieron una inyección diaria de BrdU durante tres días (ver administración de BrdU) y fueron sacrificados 76 h después de la última administración de nicotina.

TRATAMIENTO CRÓNICO DE NICOTINA

Se utilizaron 14 ratas macho de la cepa Wistar recién destetadas (21 días) mantenidas en una habitación con temperatura controlada y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con acceso libre a alimento. A su llegada todos los animales fueron pesados y marcados para ser divididos en los siguientes grupos:

- Nicotina-C: Lesión con 6OHDA en SNc y administración crónica de nicotina vía oral (VO).
- Sham-C: Lesión simulada con inyección de solución salina en SNc y administración crónica de nicotina VO.

Los animales de los grupos de administración crónica recibieron nicotina VO desde el momento en que ingresaron al vivarium (día 1). El protocolo de habituación a la nicotina VO comenzó con acceso *ad libitum* a bebederos con nicotina a una concentración de 15 mg/L, del día 1 hasta el día 4. A partir del día 5 y hasta el día 9 el acceso se redujo a 12 h diarias, y del día 9 en adelante el acceso se estableció a sólo 8 h diarias. A partir del día 15, la concentración de nicotina disuelta en agua fue incrementada en 3 mg/L cada semana hasta alcanzar una concentración final de 30 mg/L (Biondolillo, Pearce, Louder, & McMickle, 2009).

A las 9 semanas posnatales, una vez alcanzada la concentración final de nicotina (30 mg/L), se practicaron las cirugías correspondientes. Los animales de todos los grupos fueron anestesiados, perfundidos y sus cerebros fijados 6 semanas después de la cirugía (ver perfusión).

GRUPOS CONTROL

Se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar igualados en edad a los tratamientos agudo y crónico para formar los siguientes grupo control:

- Lesión-6OHDA: Lesión con 6OHDA en SNc.
- Basal-BrdU: Sin lesión y sin tratamiento.

Los grupos recibieron una inyección diaria de BrdU durante tres días (ver administración de BrdU) y fueron sacrificados 24 h después de la última inyección de BrdU.

CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Los grupos fueron sometidos a cirugía estereotáxica para lesión de SNc en el hemisferio izquierdo. Los grupos nicotina-A, nicotina-C y lesión-6OHDA recibieron inyección de 6OHDA (Sigma-Aldrich). Los grupos sham-A y sham-C fueron sujetos al

mismo protocolo con la diferencia de que en lugar de 6OHDA recibieron una inyección de solución salina.

Se anestesiaron a las ratas con una mezcla 1:3 de Xilacina-Ketamina (Pisa), se montaron con cuidado en el aparato estereotáxico y se expuso el cráneo de la rata para localizar bregma. A partir de bregma, y de acuerdo al Atlas del Cerebro de la Rata de Paxinos y Watson, se realizó una pequeña trepanación en las coordenadas: anteroposterior -4.7; lateral -1.6; y ventral -8.1 (Paxinos & Watson, 1997). En esta ubicación se inyectó 80 µg/µl de 6OHDA en 0.5 µL de solución salina o solución salina sola a una velocidad de 0.125 µL/min. La cánula se retiró lentamente 5 min después de inyectado el volumen para evitar subir la neurotoxina con la cánula.

ADMINISTRACIÓN DE BROMODEOXIURIDINA

Para estudiar la neurogénesis las ratas fueron inyectadas IP con 50 mg/kg de BrdU (Sigma-Aldrich). Estudios han mostrado que esta es una concentración suficiente para marcar alrededor del 90% de las células en proliferación durante las 2 h que permanece activo el compuesto en el sistema nervioso central (Burns & Kuan, 2005).

- Los grupos nicotina-A y sham-A: fueron inyectados una vez al día durante tres días comenzando el día del tratamiento con nicotina.
- Los grupos nicotina-C y sham-C fueron inyectados una vez al día durante tres días y 24 h después fueron sacrificados.
- Los grupos basal-BrdU y lesión-6OHDA recibieron una inyección diaria de BrdU durante tres días.

Todos los animales fueron sacrificados 24 h después de la última inyección con BrdU.

PERFUSIÓN

Para poder llevar a cabo procedimientos histológicos que requieren la mayor preservación posible del tejido, es necesario someter a los animales a perfusión intracardiaca. Todos los animales fueron profundamente anestesiados con una inyección IP de pentobarbital sódico (Pisa) y posteriormente sacrificados con una perfusión transcardial de 250 mL de solución buffer de fosfatos 1x (PBS), compuesto

de NaCl 0.8%, Na₂HPO₄ 0.115%, KH₂PO₄ 0.002% y KCl 0.002% (todo de J.T. Baker) a pH 7.2, para eliminar la sangre. El sistema vascular fue fijado con 250 mL de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4%. El cerebro se extrajo con cuidado y se almacenó en 20 mL de paraformaldehído al 4% durante 24 h. Posteriormente el paraformaldehído fue sustituido por concentraciones crecientes de sacarosa (J.T. Baker), 10%, 20% y 30%, durante 24 h cada una, manteniéndolos a una temperatura de 4 °C en todos los casos.

CORTE DE CEREBROS

Para realizar los cortes de los cerebros estos fueron colocados sobre una platina y cubiertos con OCT (*optimal cutting temperatura*, Sakura Finetek), para poder ser congelados con hielo seco. Una vez congelado el cerebro se utilizó un criostato (Leica) para cortar el estriado y la SNc de todos los animales en muestras de 40 µm.

Los cortes de estriado fueron colocados individualmente de manera seriada en cajas de ELISA con 96 pozos en solución de crio-preservación, 50% PBS, 25% glicerol y 25% etilenglicol (J.T. Baker) para poder mantenerlos a -20 °C hasta el momento de su uso. La SNc fue recolectada de forma consecutiva en tres pozos con PBS de tal manera que cada pozo es representativo de toda la SNc de la rata.

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASA

Se realizó inmunotinción flotada para tirosina hidroxilasa (TH) en el estriado y la SNc para verificar la lesión con 6OHDA. Los cortes en flotación fueron lavados primero con PBS 0.1 M. En seguida se inhibió la peroxidasa endógena con ácido peryódico (Sigma-Aldrich) al 0.28% durante 1 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 0.1 M. Los cortes se dejaron 24 h a 4 °C incubando en solución de bloqueo compuesto por PBS + BSA (albúmina sérica bovina al 2.5%, Sigma-Aldrich) + Tritón X-100 al 0.1% (Sigma-Aldrich). Posteriormente se incubaron los cortes en el anticuerpo primario (conejo anti-TH 1:1000, Millipore), diluido

en solución de bloqueo durante 48 h a 4 °C. Pasado este tiempo se lavaron los cortes tres veces durante 5 min en PBS y luego fueron incubados en el anticuerpo secundario (anti-conejo biotinilado 1:250, Vector Labs) a temperatura ambiente durante 2 h. Se realizaron nuevos lavados para poder incubar durante 30 min en complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs) preparado 30 min antes. Se lavaron nuevamente los cortes y después se revelaron con 6 mg de DAB (3,3 diaminobencidina, Sigma-Aldrich), 10 ml de PBS 0.1 M y 0.1 ml de H₂O₂ al 3%. Se realizaron lavados con PBS para después proceder con el protocolo de montaje.

Los cortes fueron montados en portaobjetos, cuatro en cada uno, y se dejaron secar una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los cortes fueron deshidratados sumergiéndolos durante 5 min en cada una de las siguientes soluciones: Alcohol 96°; alcohol absoluto (J.T Baker) y alcohol 96°; alcohol absoluto; alcohol absoluto y xilol y finalmente dos rondas en xilol (J.T. Baker). El exceso de xilol fue retirado y se colocaron dos gotas de cyto seal (Fisher Scientific) antes de cubrir las muestras con el cubreobjetos.

INMUNOFLOURESCENCIA BROMODEOXIURIDINA Y DOBLECORTINA

Se realizó una doble inmunofluorescencia flotada para BrdU y DCX para estudiar la neurogénesis en la ZSV de los animales. Para detectar BrdU es necesario en primer lugar someter los tejidos a un proceso de desnaturalización. Para este propósito los tejidos fueron incubados durante 1 h en 50% formamida (Sigma-Aldrich) en 2xSSC (buffer salino y citrato de sodio) a una temperatura de 65 °C. Después fueron lavados en 2xSSC por 10 min, posteriormente incubados en 2 N HCl (J.T. Baker) a 37 °C por 30 min, lavados con ácido bórico (J.T. Baker) a 0.1 M a pH 8.5 por 10 min y finalmente lavados en PBS por 5 min.

A continuación se inició el protocolo de inmunofluorescencia. Los cortes fueron incubados durante 1hr en solución de bloqueo (3% suero de caballo con 0.25% Triton X-100), y posteriormente dejados toda la noche en anticuerpo primario (rata anti-BrdU 1:100, Accurate Chemical) a 4 °C. Pasadas 24 h se realizan tres lavados de 10 min en PBS y en oscuridad las muestras fueron incubadas durante 2 h en el anticuerpo

secundario (burro anti-rata DyLight405 1:200, Jackson ImmunoResearch) durante 2 h. Al terminar se realizaron tres lavados de 10 min en PBS para entonces repetir el proceso con los anticuerpos para DCX (anticuerpo primario de cabra anti-DCX 1:500, y anticuerpo secundario de burro anti-cabra Alexa488 1:1000, Invitrogen). Finalmente para marcar los núcleos celulares los tejidos fueron sumergidos durante 10 min en Draq5 (1:5000, Biostatus Limited) y luego fueron lavados tres veces durante 10 min. Los cortes fueron montados en portaobjetos, protegidos con DAKO y cubiertos con un cubreobjetos para su análisis en un microscopio óptico de epifluorescencia (Leica).

CONTEOS

Se tomaron seis cortes coronales entre las coordenadas 1.20 mm y -0.40 mm a partir de bregma a intervalos de 240 μm de cada cerebro para realizar los conteos. El área de conteo se restringió a la ZSV tomando tres fotos por hemisferio como se muestra en la figura 6. En total se analizaron 36 fotos por animal con el objetivo de inmersión 40x. Las fotos fueron analizadas en el programa imageJ donde se realizaron conteos de todas las células presentes en la zona focal.

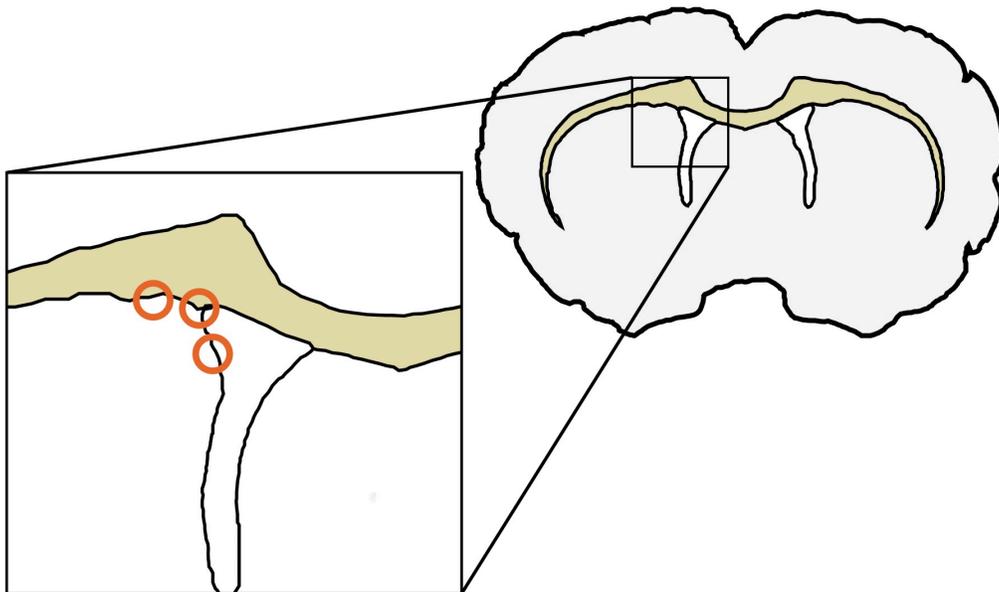


Figura 6 Esquema de las zonas a partir de las cuales se obtuvieron las imágenes para realizar conteos. Para cada hemisferio se tomaron tres fotografías de tres distintas áreas de la ZSV en el cuerno del ventrículo, en la pared del ventrículo y en el principio de la VRM.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE LESIÓN CON 6OHDA

Para verificar la eficiencia de la lesión generada con 6OHDA se realizó la inmunohistoquímica para TH en cortes coronales a nivel de SN y estriado de todos los animales en todos los grupos. En los grupos sometidos a lesión con 6OHDA se recolectaron únicamente los tejidos de los animales que reunieran las siguientes dos características 1) que a nivel de estriado en el hemisferio lesionado mostraran ausencia total de marcaje para TH y 2) que a nivel de la SN la lesión abarcara los somas dopaminérgicos de la SNc principalmente (figura 7), sin importar que ésta pudiera llegar incluso a la *substantia nigra pars reticulata* (SNr). Para los grupos control, sin lesión, se buscó que el marcaje para TH estuviera presente en ambos hemisferios.

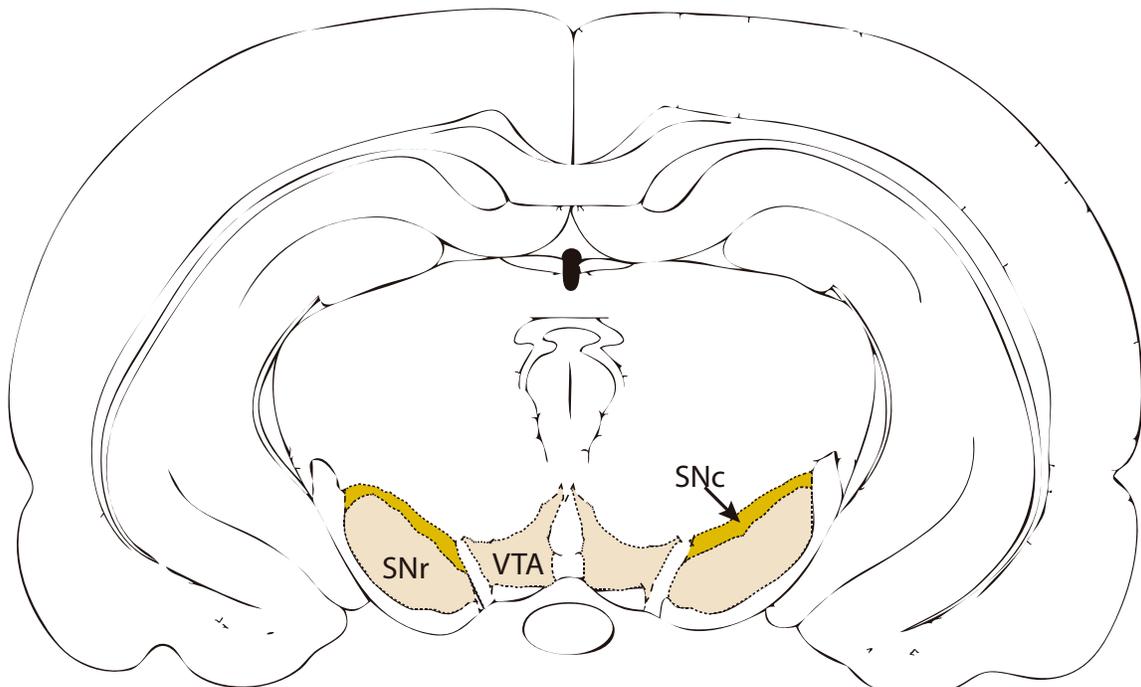


Figura 7 Corte coronal de rata a nivel de la *substantia nigra* (SN). Se muestra la ubicación de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) adyacente a la *substantia nigra pars reticulata* (SNr). También se muestra el área tegmental ventral (ATV) por ser una zona con somas dopaminérgicos cerca de la SN.

Nuestros resultados muestran que en cerebros de tejido control la expresión de TH es homogénea en los somas de las neuronas de la SNc así como en las proyecciones

estriales de ambos hemisferios (figuras 8). Por otra parte, en los grupos lesionados encontramos la ausencia de expresión de TH en el hemisferio izquierdo, tanto en SNc como en estriado (Figura 9).

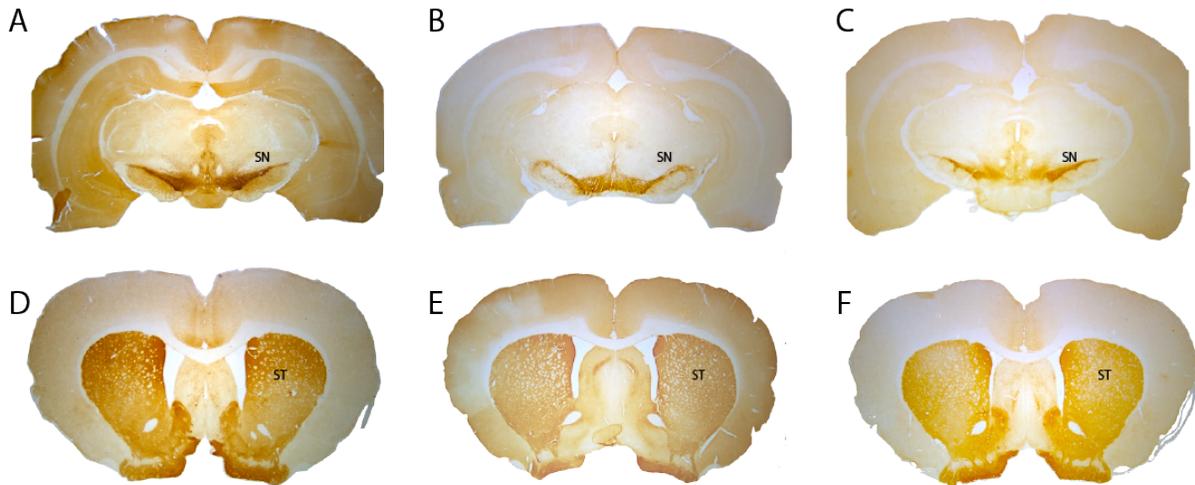


Figura 8 Cortes coronales representativas para la inmunohistoquímica de TH a nivel de estriado (ST) y *substantia nigra* (SN) de los grupos control sin lesión. En todos los grupos, basal-BrdU (A y D), sham-A (B y E) y sham-C (C y F) se observa completo el marcaje específico de TH en ambos hemisferios a nivel de SN y ST.

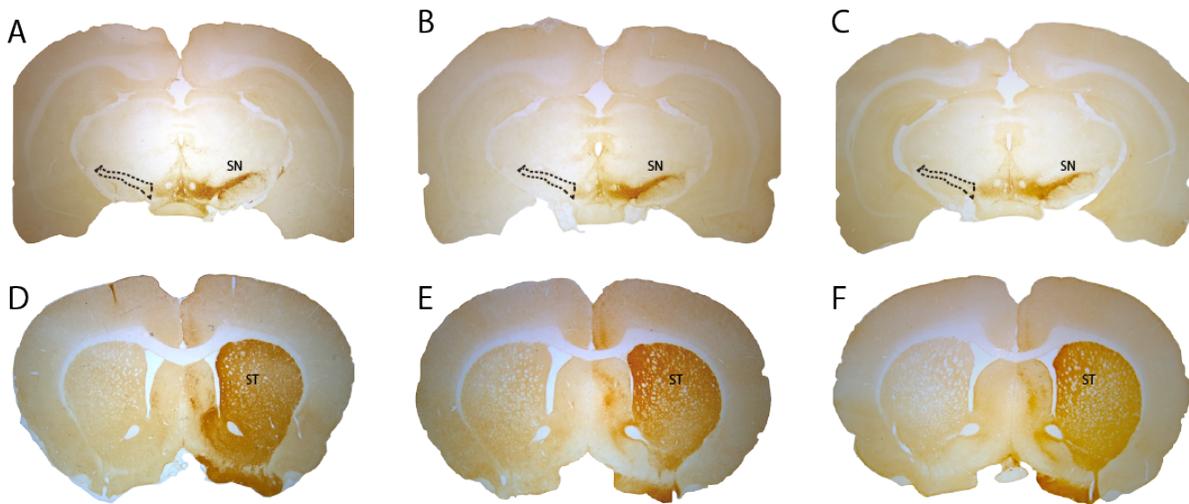


Figura 9 Cortes coronales representativas de la inmunohistoquímica para TH a nivel de estriado (ST) y *substantia nigra* (SN) de los grupos sometidos a lesión con 6OHDA. En todos los grupos, lesión-6OHDA (A y D), nicotina-A (B y E) y nicotina-C (C y F) se observa la ausencia de marcaje en el hemisferio izquierdo a nivel de SN y ST.

NO HAY DIFERENCIAS ENTRE HEMISFERIOS EN NINGUNA DE LAS CONDICIONES

Para determinar los niveles de neurogénesis en la ZSV bajo nuestras condiciones experimentales realizamos ensayos de doble inmunofluorescencia con el propósito de estimar el número de neuronas inmaduras (DCX⁺) generadas recientemente (BrdU⁺). El marcador de ADN Draq5 se empleó en conjunto con los otros marcadores para visualizar los núcleos celulares y determinar con mayor precisión el número total de células marcadas por campo. Un conteo manual con ayuda del programa imageJ nos permitió determinar el número total de células positivas para el marcaje con BrdU⁺/Draq5⁺, DCX⁺/Draq5⁺ y BrdU⁺/DCX⁺/Draq5⁺, en cada una de las tres zonas analizadas (mediante microscopía) en todas las muestras de los diferentes grupos.

Realizamos el primer contraste utilizando la prueba Wilcoxon para muestras pareadas con el fin de buscar diferencias en la distribución de células para cada hemisferio (derecho e izquierdo) de todos los grupos (nicotina-A, sham-A, nicotina-C, sham-C, basal-BrdU y lesión-6OHDA). En la tabla 3 se observa que las medianas no difirieron de manera estadísticamente significativamente entre hemisferios para ninguno de los diferentes grupos, incluyendo aquellos sometidos a tratamiento de nicotina o lesión unilateral con 6OHDA, en ninguna de las inmunofluorescencias evaluadas.

Tabla 3 Resultados de la prueba rangos de Wilcoxon para muestras pareadas. Comparación entre hemisferios para todos los grupos. Basal-BrdU (BB), lesión-6OHDA (L6OHDA), sham-A (SA), sham-C (SC), nicotina-A (NA) y nicotina-C (NC).

Grupo	valor P		
	BrdU ⁺	DCX ⁺	BrdU ⁺ /DCX ⁺
BB	0.893	0.893	0.893
L6OHDA	0.345	0.686	0.686
SA	0.686	0.893	0.893
SC	0.735	0.735	1
NA	0.686	0.686	0.343
NC	0.173	0.612	0.612

EL TRATAMIENTO AGUDO DE NICOTINA NO MODIFICA LA NEUROGÉNESIS DE LA ZSV

Debido a que no se encontraron diferencias entre hemisferios para ninguno de los grupos, en ninguna de las condiciones, los cerebros se trataron como un objeto completo integrando los datos de ambos hemisferios en uno solo. La prueba Kruskal-Wallis se utilizó para buscar diferencias entre los grupos (nicotina-A, sham-A, basal-BrdU y lesión-6OHDA) del tratamiento agudo de nicotina IP. Al buscar cambios en la mediana de los grupos medida por número de células marcadas no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las inmunofluorescencias estudiadas (BrdU⁺/Draq5⁺, DCX⁺/Draq5⁺ y BrdU⁺/DCX⁺/Draq5⁺) como se observa en la figura 10. Al no encontrarse valores p menores a $\alpha=.05$ no se realizaron las comparaciones múltiples. Al no haber diferencia entre las medianas podemos suponer que las medias tampoco varían.

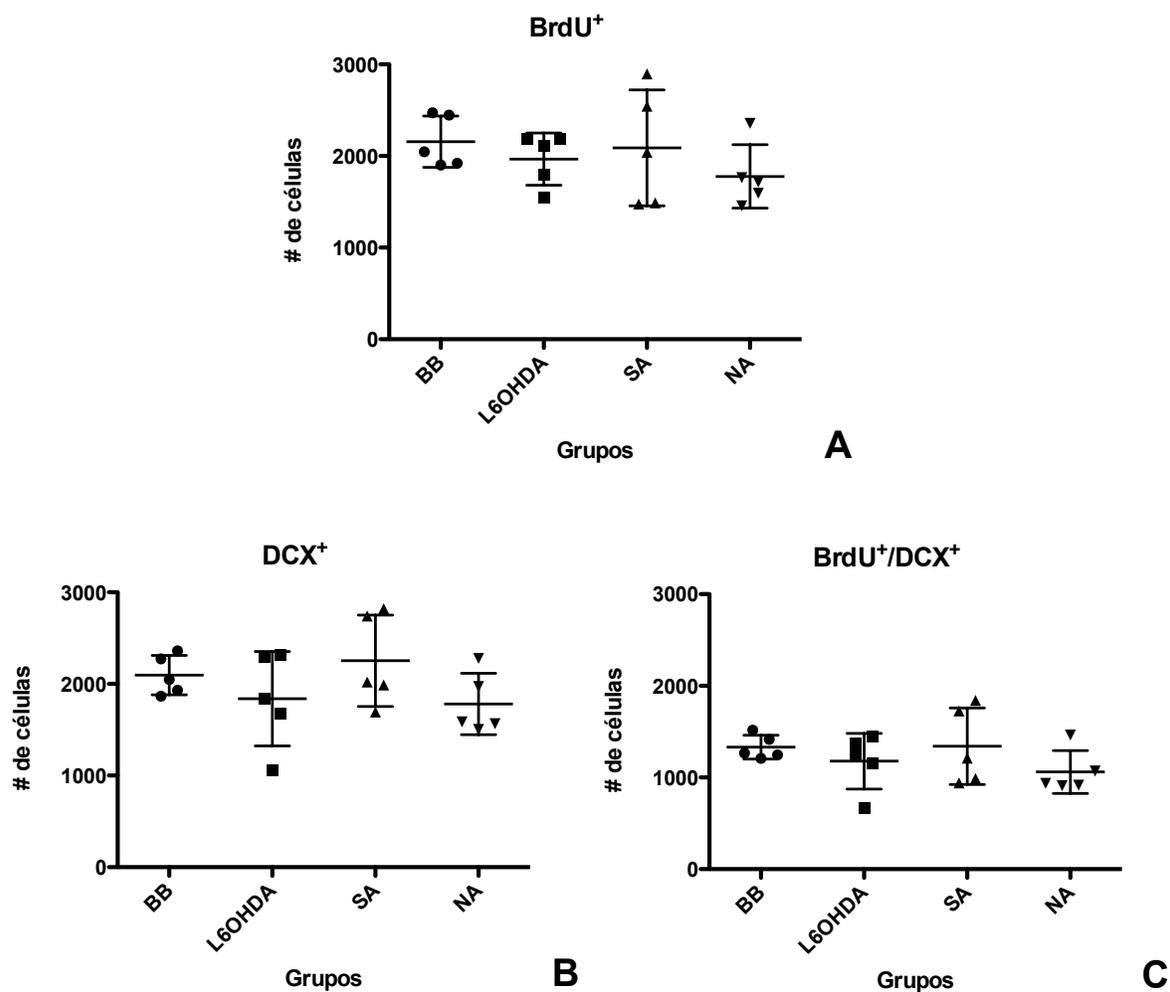


Figura 10 Número de células generadas bajo el tratamiento agudo de nicotina. La prueba Kruskal-Wallis para las inmunofluorescencias BrdU⁺ (A), DCX⁺ (B) y BrdU⁺/DCX⁺ (C) indica que no existen cambios significativos en las medianas obtenidas a partir del número de células producidas en los diferentes tratamientos. Los resultados de la prueba fueron A) $\chi^2(3, N=20)=2.84, p=.42$; B) $\chi^2(3, N=20)=4.09, p=.25$; y C) $\chi^2(3, N=20)=3.73, p=.29$. Los grupos evaluados fueron basal-BrdU (BB), lesión-6OHDA (L6OHDA), sham-A (SA) y nicotina-A (NA), N=5. Draq5⁺ se utilizó como control de núcleos en todas las inmunofluorescencias evaluadas. Cada punto de la distribución representa a uno de los animales del grupo.

EL TRATAMIENTO CRÓNICO DE NICOTINA DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN EN LA ZSV

El tratamiento crónico de nicotina fue estudiado con la prueba Kruskal-Wallis. Se llevó a cabo el contraste de medianas entre grupos (nicotina-C, sham-C, basal-BrdU y lesión-6OHDA) del tratamiento crónico de nicotina VO para todos los marcajes (BrdU⁺/Draq5⁺, DCX⁺/Draq5⁺ y BrdU⁺/DCX⁺/Draq5⁺). El análisis con esta prueba mostró diferencias significativas en las tres pruebas generales realizadas, en particular el grupo nicotina-C fue el que obtuvo los puntajes más bajos (figura 11).

Se realizaron comparaciones múltiples para identificar las parejas de grupos con diferencias significativas en su distribución (barras grises en la figura 11). El resultado de las comparaciones múltiples mostró diferencias entre los grupos nicotina-C y basal-BrdU en las tres combinaciones de inmunofluorescencia con valores $p=.002$, $p=.02$ y $p=.003$ respectivamente (figura 11 A-C). También se encontraron diferencias entre los grupos nicotina-C y sham-C en la inmunofluorescencia de BrdU⁺ y BrdU⁺/DCX⁺/Draq5⁺ (figura 11 A y C), con $p=.04$ y $p=.006$ respectivamente. Por último, el marcaje BrdU⁺ difirió significativamente entre los grupos nicotina-C y lesión-6OHDA con un valor $p=.02$ (figura 11 A). La distribución del grupo nicotina-C es estadísticamente diferente del grupo basal-BrdU por lo que se puede decir que provienen de poblaciones distintas, y valores menores en los conteos obtenidos indican una disminución en la proliferación del grupo nicotina-C.

En las figuras 12, 13 y 14 se muestran imágenes representativas de las inmunofluorescencias para todos los grupos del tratamiento crónico y sus controles en cada una de las tres zonas de donde se obtuvieron fotografías, cuerno del ventrículo (figura 12), pared lateral (figura 13) y VRM (figura 14).

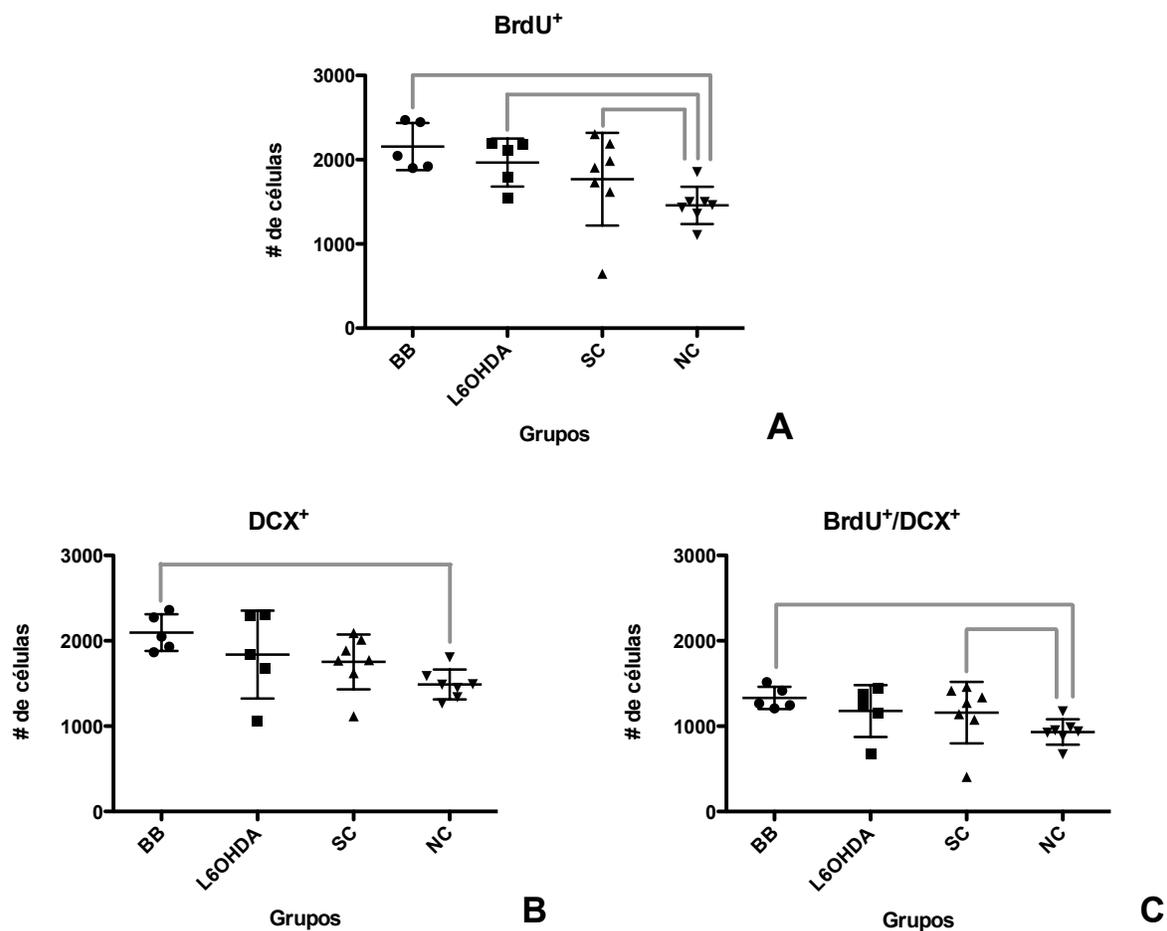


Figura 11 Número de células generadas bajo el tratamiento crónico de nicotina. La prueba de Kruskal-Wallis para las inmunofluorescencia BrdU⁺ (A), DCX⁺ (B) y BrdU⁺/DCX⁺ (C) indicó una diferencia significativa en el número de células producidas entre los grupos con los siguientes resultados: A) $\chi^2(3, N=24)=11.02, p=.01$; B) $\chi^2(3, N=24)=9.64, p=.02$; y C) $\chi^2(3, N=24)=8.55, p=.03$. Los grupos evaluados fueron basal-BrdU (BB), lesión-6OHDA (L6OHDA), sham-C (SC) y nicotina-C (NC). N=5 en grupos BB y L6OHDA, N=7 en SC y NC. DraG5⁺ se utilizó como control de núcleos en todas las inmunofluorescencias evaluadas. Cada punto de la distribución representa a uno de los animales del grupo.

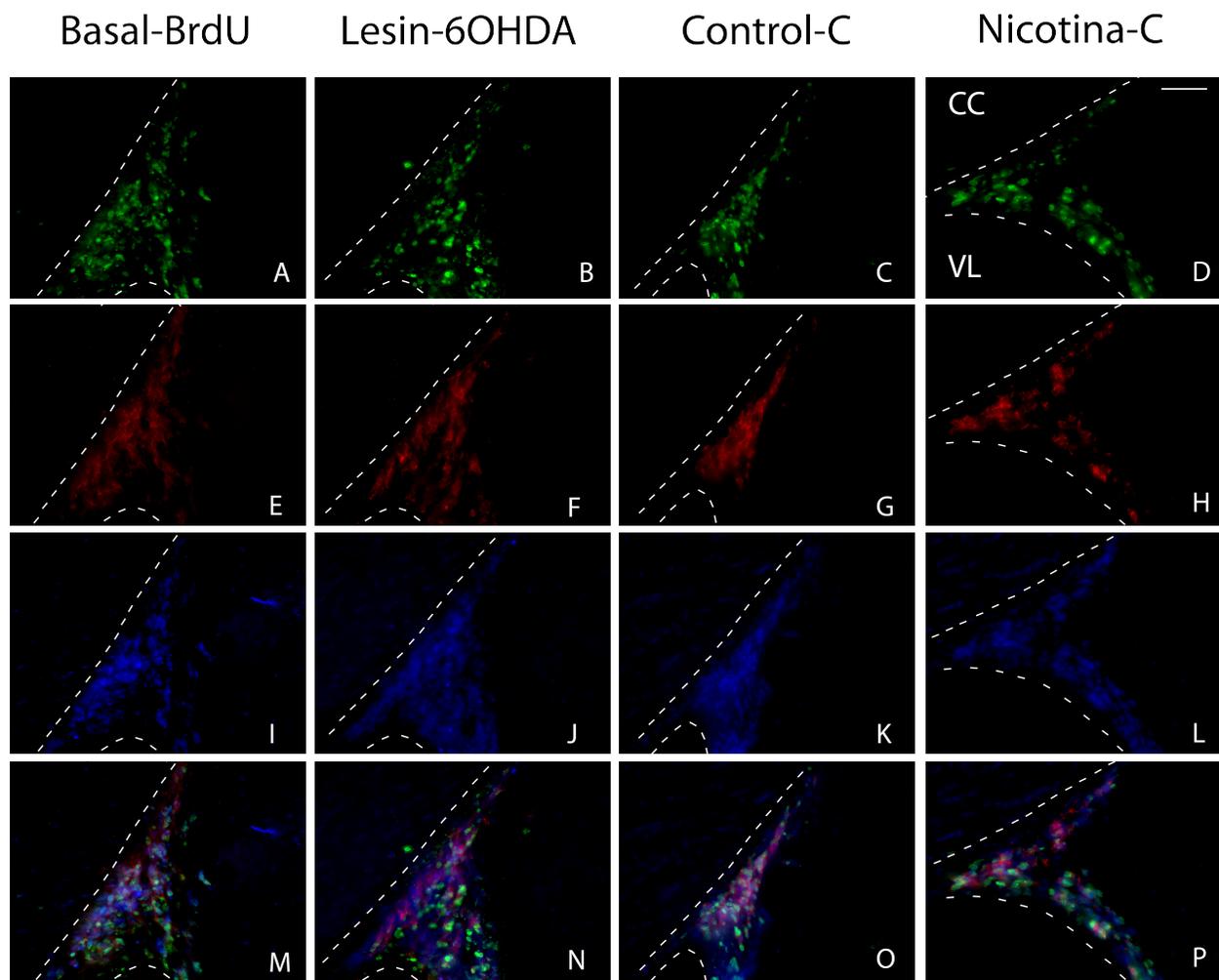


Figura 12 Imágenes de inmunofluorescencias del cuerno del ventrículo de cerebros tratados crónicamente con nicotina basal-BrdU (A, E, I y M), lesión-6OHDA (B, F, J y N), sham-C (C, G, K y O) y nicotina-C (D, H, L y P). El cuerno del ventrículo se forma en el área de la ZSV donde el ventrículo lateral (VL) se encuentra con el cuerpo calloso (CC). Ambas estructuras están delimitadas en la imagen por las líneas punteadas. En verde se muestra el marcaje para BrdU (A-D), en rojo el de DCX (E-H), y en azul el de Draq5 (I-L); en los recuadros M-P se muestra la unión de los tres canales. Magnificación de 40x, la barra de escala representa 50 μ m y es igual para todos los recuadros.

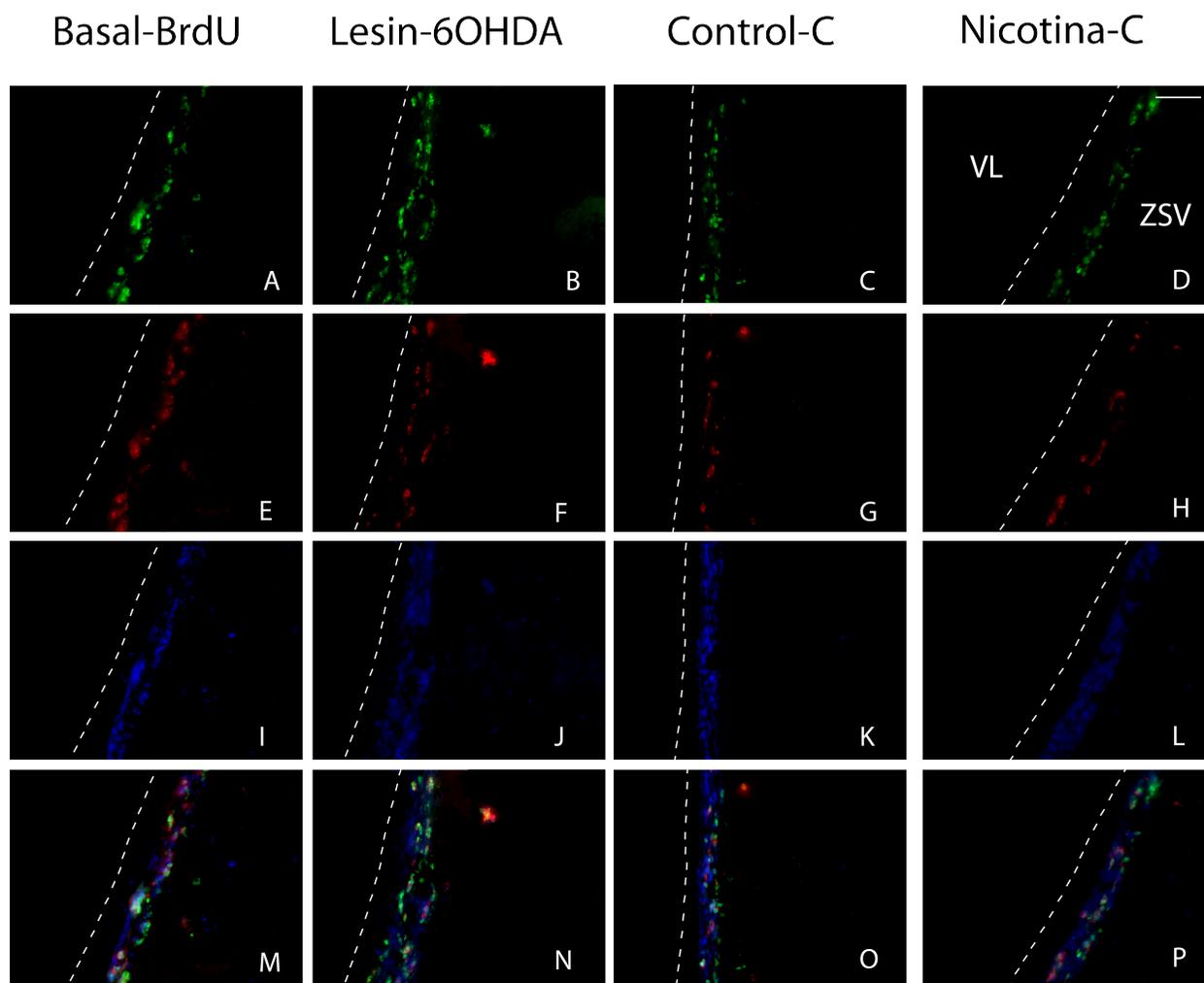


Figura 13 Imágenes de inmunofluorescencias de la pared del ventrículo de cerebros tratados crónicamente con nicotina basal-BrdU (A, E, I y M), lesión-6OHDA (B, F, J y N), sham-C (C, G, K y O) y nicotina-C (D, H, L y P). La línea punteada en las imágenes representa la pared del ventrículo; a la izquierda se ubica el ventrículo lateral (VL) y por la derecha la zona subventricular (ZSV). En verde se muestra el marcaje para BrdU (A-D), en rojo el de DCX (E-H), y en azul el de Draq5 (I-L); en los recuadros M-P se muestra la unión de los tres canales. Magnificación 40x, la barra de escala representa 50 μ m y es igual para todos los recuadros.

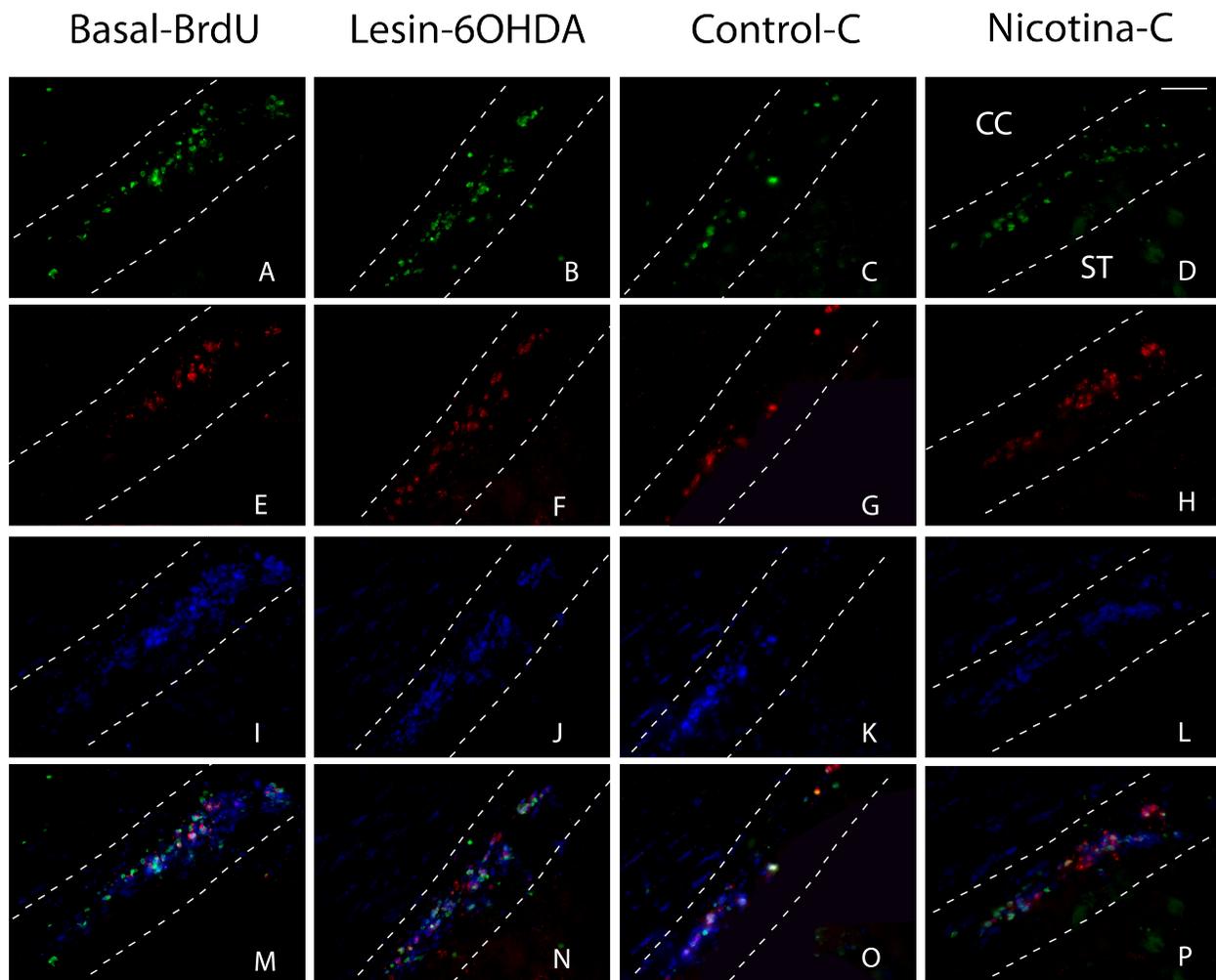


Figura 14 Imágenes de inmunofluorescencias de una parte de la VRM de cerebros tratados crónicamente con nicotina, basal-BrdU (A, E, I y M), lesión-6OHDA (B, F, J y N), sham-C (C, G, K y O) y nicotina-C (D, H, L y P). La VRM se muestra en los recuadros como la zona contenida dentro de las líneas punteadas, delimitada por encima por el cuerpo calloso (CC) y debajo por el estriado (ST). En verde se muestra el marcaje para BrdU (A-D), en rojo el de DCX (E-H), y en azul el de Draq5 (I-L) en los recuadros M-P se muestra la composición de los tres canales. Magnificación 40x, la barra de escala representa 50 μ m y es igual para todos los recuadros.

EL TRATAMIENTO CON NICOTINA INDUJO DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Por último se llevó a cabo un análisis utilizando la prueba t de Student¹ para muestras pareadas con el objetivo de identificar diferencias en el número de células con y sin

¹ Los datos de cada grupo fueron estandarizados para verificar el supuesto de normalidad y poder utilizar esta prueba paramétrica.

marcaje de DCX⁺ en la población de células BrdU⁺ (tabla 4). La prueba resultó significativa para un incremento en la proporción de células comprometidas al linaje neuronal en el caso de los grupos basal-BrdU, sham-A, sham-C, nicotina-A y nicotina-C, en la tabla 4. El grupo lesión-6OHDA no obtuvo una diferencia estadísticamente relevante entre el número de neuronas inmaduras y células no identificadas marcadas con BrdU. En la figura 15 se muestra la proporción de células con y sin marcaje para DCX en el total de células BrdU⁺.

Tabla 4 Resultados de la prueba t de Student para muestras relacionadas de la cantidad de células con y sin DCX en la población de BrdU para cada grupo.

Grupo	t	gl	valor P
BB	-12,461	4	0
L6OHDA	-12,461	4	0.078
SA	-5,231	4	0.006
SC	-7,443	6	0
NA	-4,834	4	0.008
NC	-9,248	6	0

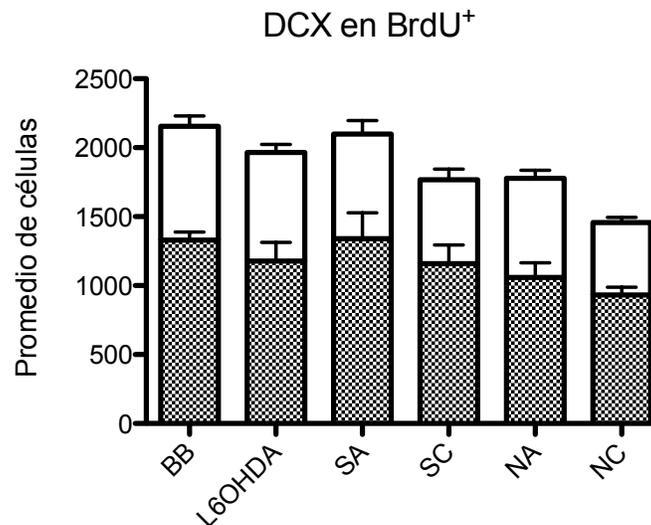


Figura 15 Proporción de células DCX⁺ en la población de células BrdU⁺ para cada grupo. Las barras representan el total promedio de las células BrdU⁺. La parte oscura muestra el promedio de células DCX⁺ mientras que la región clara es el promedio de células BrdU⁺ sin marcaje para DCX. Los grupos fueron evaluados por separado. Los grupos son: basal-BrdU (BB), lesión-6OHDA (L6OHDA), sham-A (SA), sham-C (SC), nicotina-A (NA) y nicotina-C (NC). N=5 en grupos BB, L6OHDA, SA y NA, y N=7 en SC y NC.

DISCUSIÓN

Los objetivos del presente trabajo se centraron en estudiar la capacidad de la nicotina, administrada de manera aguda y crónica, para modular la neurogénesis de la ZSV en un modelo de lesión con 6OHDA llevado a cabo en ratas adultas. El fin del trabajo fue estudiar la neurogénesis en el contexto de un daño similar al que caracteriza a la EP.

Los resultados obtenidos de la administración aguda de nicotina nos indican que no existe incremento en la proliferación celular de la ZSV. De acuerdo a la prueba estadística realizada para comparar hemisferios no hubo diferencias significativas dentro de los grupos para ninguna de las condiciones analizadas (tabla 3). De mayor interés resulta que no se encontraran diferencias en el grupo lesión-6OHDA donde se esperaba, de acuerdo a la literatura (Höglinger et al., 2004; O'Keeffe, Barker, et al., 2009; Winner et al., 2006), que la lesión con 6OHDA ocasionara una disminución en la proliferación cuantificada utilizando el número de células que incorporaron BrdU debido a la ausencia de estimulación dopaminérgica sobre las células blanco en la ZSV.

Existen al menos dos razones que podrían explicar por qué los grupos lesión-6OHDA y basal-BrdU no presentan una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a proliferación a) el protocolo de una inyección diaria de BrdU durante tres días no es lo suficientemente sensible para detectar cambios en el número de nuevas células, o b) el efecto de lesionar directamente la SNc difiere al obtenido tras lesionar todo el haz medial que incluye a la vía dopaminérgica mesolímbica, además de la nigroestriatal.

Tomando en cuenta que el protocolo de administración de BrdU utilizado en este trabajo difiere poco al implementado por otros grupos que han reportado disminución en la proliferación de la ZSV producido por denervación dopaminérgica (Höglinger et al., 2004; O'Keeffe, Tyers, et al., 2009; Sui, Horne, & Stanić, 2012), consideramos que el resultado observado no es una deficiencia del protocolo de administración de BrdU utilizado, asimismo nos inclinamos a considerar que el efecto sobre la neurogénesis de la lesión con 6OHDA en la SNc difiere del que se observa al realizar la lesión en el haz medial.

Acorde a los resultados que obtuvimos, existen reportes recientes que sostienen que no hay disminución en la proliferación tras lesionar la SNc (Lennington et al., 2011; van den Berge et al., 2011). Uno de estos trabajos, utilizando un protocolo de administración crónica de MPTP en ratones para inducir degeneración dopaminérgica en la vía nigroestriatal, concluyó que el número de células marcadas con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) no difiere al comparar con respecto a un grupo control (Van den Berge et al., 2011). Este grupo también llevó a cabo estudios en tejidos humanos obtenidos a partir de pacientes en tres condiciones, a) con diagnóstico de EP; b) sin diagnóstico de EP pero con presencia de cuerpos de Lewy y c) personas sin diagnóstico de EP ni presencia de cuerpos de Lewy. Al realizar la comparación, no encontraron diferencias en cuanto a la proliferación de la ZSV (Van den Berge et al., 2011).

Debido a que no encontramos que la lesión de la SNc alterara de forma negativa la proliferación celular en el nicho neurogénico, es posible que existan otros mecanismos que puedan estar regulando el mantenimiento de dicha proliferación. Por ejemplo, estudios realizados con una línea de ratones mutantes que presentan una degeneración de somas dopaminérgicos en la SNc apoyan la noción de que esta ausencia de estimulación no afecta la tasa proliferante de la ZSV y proponen además, que hay DA proveniente del ATV en la ZSV que es suficiente para regular la proliferación (Lennington et al., 2011). En principio la nicotina podría promover la liberación de DA desde el ATV, ya que se ha observado que neuronas dopaminérgicas en el ATV expresan nAChR y son activadas tras su estimulación (Zhao-Shea et al., 2011).

El ATV, ubicada en la vecindad de la SN (figura 7), forma parte de dos vías dopaminérgicas diferentes de la vía nigroestriatal, la mesocortical como principal fuente de DA para la corteza frontal y giro cingulado y la mesolímbica que mantiene proyecciones al sistema límbico, que incluye al hipocampo, amígdala y el núcleo accumbens. La vía mesolímbica ha sido estudiada por su papel en la motivación y adicción ya que se ha observado que la liberación de DA en el núcleo accumbens

desde el ATV está asociada a conductas adictivas, como lo es el hábito de fumar (Dani, Jenson, Broussard, & De Biasi, 2011).

Si bien la principal degeneración dopaminérgica en la EP se encuentra en la vía nigroestriatal, también existe daño en las otras vías dopaminérgicas. Por ejemplo, el ATV presenta una pérdida de volumen de alrededor del 30% en etapas tardías de la EP (McRitchie, Cartwright, & Halliday, 1997), lo que parece indicar que el ATV tiene mayor resistencia a la degeneración. Evidencia de esto está en la menor susceptibilidad que presentan las células del ATV al daño por acumulación de α -sinucleínas, el principal componente de los cuerpos de Lewy estudiado en ratones (Maingay, Romero-Ramos, Carta, & Kirik, 2006) y a la degeneración por inyección sistémica de MPTP llevados a cabo en primates (Freundlieb et al., 2006). El equipo de Maingay argumenta que esto podría deberse a que las células de la SNc, comparadas con las del ATV, tienen una mayor cantidad de DAT y una menor cantidad de VMAT2, enzima encargada de introducir la DA en las vesículas, lo que haría a las células dopaminérgicas de la SNc más susceptibles a la citotoxicidad mediada por el metabolismo de la DA.

Esto podría tener relevancia para la EP por las implicaciones cognitivas de la pérdida de volumen en el ATV, como pudiera ser la depresión. La depresión es uno de los síntomas no motores más frecuentemente encontrado en pacientes de la EP afectando entre el 20 y 40% de los pacientes (Lieberman, 2006). Estudios en primates no humanos han comenzado a elucidar su relación con la pérdida de DA en el sistema nervioso central, como el realizado recientemente por un grupo de investigación al describir la apatía, una manifestación de la depresión, en función del grado de daño a neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica (Brown et al., 2012).

En relación al marcaje para DCX en el tratamiento agudo encontramos resultados similares a los obtenidos con BrdU; el número de células positivas para DCX no difirió entre hemisferios (tabla 3) ni entre grupos (figura 10B). La ausencia de diferencias para el marcaje de DCX entre grupos con lesión 6OHDA en la SNc (lesión-6OHDA y nicotina-A) y grupos sin lesión (basal-BrdU y control-A) está en concordancia con reportes recientes que indican que la lesión con 6OHDA en la SNc no modifica el número de células marcadas con DCX respecto a animales control (Sui et al., 2012).

Además, al no encontrar diferencias entre los grupos de nicotina aguda (nicotina-A y control-A) y los grupos basal-BrdU y lesión-6OHDA sin nicotina (figura 10B), concluimos que la estimulación nicotínica aguda no tiene efecto sobre la tasa global de formación de neuroblastos estudiado a partir del marcaje para DCX. Cabe recalcar que el marcaje para DCX por inmunofluorescencia detecta el marcador expresado por las células al momento del sacrificio; la inmunofluorescencia de BrdU en cambio, permite visualizar las células que tuvieron división celular durante las dos horas siguientes a la administración IP.

Por todo lo anterior, es posible que el sitio donde se realiza la lesión sea responsable de algunas de las diferencias observadas por nosotros al lesionar la SNc con respecto a lo reportado por otros grupos que realizan lesiones en todo el haz medial, que incluye a las fibras de la vía mesolímbica (Höglinger et al., 2004; O'Keeffe, Barker, et al., 2009; Winner et al., 2006). Al no observar que la ausencia de estimulación dopaminérgica proveniente de la SNc alterara la tasa neurogénica normal consideramos de interés explorar el efecto de la lesión a nivel del ATV, con y sin lesión de la SNc, sobre la neurogénesis en la ZSV; para detallar los papeles individuales que ejercen los núcleos que proveen de DA a la ZSV.

Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la proliferación (BrdU) y formación de neuroblastos (DCX), aunado a lo discutido con respecto a las publicaciones más recientes, nos llevan a reconsiderar la hipótesis anteriormente planteada por otros, con respecto a la necesidad de la estimulación dopaminérgica proveniente de la SNc para la proliferación a nivel de la ZSV. Nosotros nos inclinamos por una nueva hipótesis donde el papel de la DA para la neurogénesis de la ZSV es menos protagónico.

De manera interesante, aun cuando en el tratamiento agudo, grupos nicotina-A y control-A, no se observaron cambios significativos en la proliferación y neurogénesis de la ZSV con respecto al grupo basal-BrdU y lesión-6OHDA, en el tratamiento crónico se encontró que la proliferación disminuyó significativamente en grupos tratados crónicamente con nicotina VO (figura 11). También resulta en una menor cantidad de neuroblastos migrantes, comparado con las condiciones del grupo basal-BrdU (figura

11B) y una menor cantidad de células que colocan BrdU y DCX (figura 11C) comparado con los grupos basal-BrdU y control-C.

Consideramos que estos resultados se deben a la acción combinada entre la administración crónica de nicotina y la lesión de la SNc, ya que los resultados comentados anteriormente para el grupo lesión-6OHDA nos indican que el daño a la SNc por si sola no disminuye el número de células BrdU⁺ ni DCX⁺. El tratamiento crónico de nicotina, entonces, no sólo no promueve la proliferación en la ZSV, sino que en conjunto con la lesión de 6OHDA la reduce.

Un efecto inhibitorio de la nicotina ha sido descrito con anterioridad en el GD de ratas sanas al ser sometidas a un tratamiento intravenoso crónico de 42 días. En este estudio se observó que la proliferación (número de células BrdU⁺) disminuyó dependiendo de la dosis de nicotina que consumieron las ratas; a mayor consumo menor proliferación (Abrous et al., 2002). Sin embargo, en este mismo artículo evaluaron la proliferación de la ZSV de las mismas ratas sin encontrar diferencias. Este resultado podría equipararse con lo que nosotros obtuvimos para el grupo control-C, una administración crónica de nicotina en ratas sanas en donde no observamos diferencias con respecto al grupo basal-BrdU.

En nuestro estudio queda claro que existen diferencias importantes en la respuesta de la ZSV al tratamiento agudo y crónico de nicotina. Mientras no encontramos reacción al tratamiento agudo de nicotina, el tratamiento crónico indujo una reducción en la proliferación en conjunto con la lesión 6OHDA. El mecanismo por el cual hay reducción en la proliferación en el contexto de lesión y administración crónica de nicotina queda por ser estudiado. Para comenzar a elucidar los mecanismos sería de utilidad utilizar marcadores para apoptosis.

Por último, llevamos a cabo un análisis sobre la cantidad de células diferenciadas a neuronas (DCX⁺) dentro de la población de células BrdU⁺ para cada grupo. Con excepción del grupo lesión-6OHDA la tasa de células comprometidas al linaje neuronal fue mayor que el número de células en proliferación, es decir, tanto en los grupos sometidos a tratamiento con nicotina (tratamiento agudo y crónico) como en el grupo

basal-BrdU, la mayor cantidad de células BrdU⁺ son también DCX⁺. Este resultado es interesante debido a que aunque en los grupos de administración crónica de nicotina hay una proliferación global menor, los resultados sugieren que de manera focalizada son una mayoría las células que se comprometen al linaje neuronal (tabla 4).

La nicotina puede estimular que las células se comprometan al linaje neuronal, al menos en parte, mediante los mecanismos propuestos para la actividad de la nicotina sobre la neurogénesis de la ZSV (figura 5) y su capacidad para liberar FGF-2 desde células gliales en contacto con células tipo C (Mudò et al., 2007), hay evidencia de que FGF-2 estimula preferentemente la formación de neuroblastos migrantes (Kuhn et al., 1997; Peng et al., 2008).

Por otro lado, en el grupo lesión-6OHDA, encontramos el primer indicio de una deficiencia del nicho neurogénico asociado al daño de células de la SNc al no encontrar diferencias entre el número de células con y sin DCX⁺ en la población de BrdU⁺, lo que sugiere una menor tasa de diferenciación (figura 15). Se deben realizar más estudios para identificar los mecanismos por los que la lesión de SNc con 6OHDA ocasiona esta sutil disminución en la diferenciación. Para continuar estudiando el fenómeno de diferenciación consideramos necesario determinar el fenotipo de las células que son sólo BrdU⁺ en todos los grupos utilizando un marcador para glía, por ejemplo GFAP y explorar el estado de FGFR1 en animales lesionados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos llevan a reconsiderar nuestra hipótesis inicial de la capacidad de la nicotina para estimular la producción de células en el nicho neurogénico de la ZSV del roedor, debido a que no pudimos encontrar evidencia que confirmara este supuesto. En primer lugar, debido a que no encontramos una disminución estadísticamente significativa en la proliferación tras la lesión con 6OHDA, consideramos que el nicho neurogénico de la ZSV tiene mecanismos regulatorios endógenos que mantienen la proliferación en una tasa estable, proponemos que uno de estos mecanismos podría ser la DA proveniente del ATV, núcleo que ha comenzado a ser estudiado por su posible papel en la depresión. Otro probable mecanismo podría involucrar a la serotonina, este neurotransmisor es liberado en la ZSV desde los núcleos del rafé (Brezun & Daszuta, 1999; Jahanshahi, Temel, Lim, Hoogland, & Steinbusch, 2011).

En segundo lugar, encontramos que la administración aguda IP de nicotina no promovió la proliferación en la ZSV y suponemos la posibilidad de que este nicho neurogénico en condiciones normales ya se encuentre funcionando al máximo de su capacidad. Estudios de administración crónica intravenosa de nicotina también han dejado de manifiesto que no ha sido posible inducir un incremento en la proliferación de este nicho, e incluso que a nivel de GD del hipocampo ésta es inhibida. En nuestro estudio identificamos una reducción en la proliferación tras la administración crónica VO de nicotina en animales lesionados con 6OHDA. Esta disminución es específica del grupo nicotina-C, por lo que se debe a un efecto combinado de la lesión y la estimulación crónica de nicotina, los mecanismos subyacentes quedan por ser estudiados; proponemos comenzar con un marcador para apoptosis para descartar que sea un incremento en la muerte celular la causa de esta disminución.

Por último, identificamos que la administración de nicotina, en el tratamiento agudo y crónico, promovió la diferenciación neuronal en los grupos sometidos a tratamiento. En las condiciones basales evaluadas a partir del grupo control basal-BrdU, la mayor diferenciación fue neuronal, mientras que en el grupo lesionado no hubo una mayor

cantidad de células que expresaran el marcador para neuronas DCX. Suponemos que este resultado se pudo generar vía activación de receptores nicotínicos que ocasiona la liberación de FGF-2, para confirmarlo se podría estudiar el factor de crecimiento en el grupo lesión-6OHDA. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, encontramos que la nicotina no contribuyó a promover la proliferación de células en la ZSV, sin embargo indujo diferenciación neuronal en las células que proliferaron.

El estudio de la neurogénesis es un tema de sumo interés en la investigación contemporánea debido a que aún no comprendemos completamente la función, implicaciones y alcances de esta asombrosa capacidad del cerebro. La relación que existe entre los nichos neurogénicos conocidos y algunos núcleos asociados con síntomas motores y no motores de la EP, hace del fenómeno un gran tema de investigación. Específicamente la nicotina tiene relevancia para el estudio de la EP por mantener una correlación negativa con la incidencia de la enfermedad, y tener la capacidad de interactuar con el sistema colinérgico. Un estudio que debe llevarse a cabo es determinar qué efecto tiene la disminución de la proliferación en la ZSV aunado a la lesión con 6OHDA a nivel de la integración neuronal en BO y si existen

REFERENCIAS

- Abrous, D. N., Adriani, W., Montaron, M.-F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., & Piazza, P. V. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *The Journal of Neuroscience*, *22*(9), 3656–62. doi:20026324
- Aguirre, A., & Gallo, V. (2007). Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron Glia Biology*, *3*(3), 209–20. doi:10.1017/S1740925X08000082
- Alonso, M., Ortega-Pérez, I., Grubb, M. S., Bourgeois, J.-P., Charneau, P., & Lledo, P.-M. (2008). Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *The Journal of Neuroscience*, *28*(43), 11089–102. doi:10.1523/JNEUROSCI.3713-08.2008
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the Brains of Adult Mammals? *Science*, *135*(3509), 1127–1128.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *124*(3), 319–35.
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., & Masuda, M. (2010). Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatrics & Gerontology International*, *10 Suppl 1*, S148–57. doi:10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x
- Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T., & Drucker-Colín, R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Revisión en Neurociencia*, *44*(9), 541–550.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Dopamina : síntesis , liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, *11*(1), 39–60.
- Baron, J. a. (1996). Beneficial effects of nicotine and cigarette smoking: the real, the possible and the spurious. *British Medical Bulletin*, *52*(1), 58–73.
- Bath, K. G., & Lee, F. S. (2010). Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Developmental Neurobiology*, *70*(5), 339–49. doi:10.1002/dneu.20781
- Belluardo, N., Mudò, G., Blum, M., & Fuxe, K. (2000). Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behavioural Brain Research*, *113*(1-2), 21–34.

Belluardo, N., Mudò, G., Bonomo, A., Di Liberto, V., Frinchi, M., & Fuxe, K. (2008). Nicotine-induced fibroblast growth factor-2 restores the age-related decline of precursor cell proliferation in the subventricular zone of rat brain. *Brain Research*, 1193, 12–24. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.069

Belluardo, N., Mudò, G., Caniglia, G., Cheng, Q., Blum, M., & Fuxe, K. (1999). The nicotinic acetylcholine receptor agonist ABT-594 increases FGF-2 expression in various rat brain regions. *Neuroreport*, 10(18), 3909–13.

Biondolillo, K., Pearce, A. R., Louder, M. C., & McMickle, A. (2009). Solution concentration influences voluntary consumption of nicotine under multiple bottle conditions. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 92(2), 214–8. doi:10.1016/j.pbb.2008.12.002

Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–10. doi:10.1155/2012/845618

Bordia, T., Campos, C., McIntosh, M., & Quik, M. (2010). Nicotinic receptor-mediated reduction in L-DOPA-induced dyskinesias may occur via desensitization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(3), 929–38. doi:10.1124/jpet.109.162396

Bordia, T., Grady, S. R., McIntosh, M., & Quik, M. (2007). Nigrostriatal damage preferentially decreases a subpopulation of alpha6beta2* nAChRs in mouse, monkey, and Parkinson's disease striatum. *Molecular Pharmacology*, 72(1), 52–61. doi:10.1124/mol.107.035998

Brezun, J., & Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, 89(4), 999–1002.

Brown, C. A., Campbell, M. C., Karimi, M., Tabbal, S. D., Loftin, S. K., Tian, L. L., Moerlein, S. M., et al. (2012). Dopamine pathway loss in nucleus accumbens and ventral tegmental area predicts apathetic behavior in MPTP-lesioned monkeys. *Experimental Neurology*, 236(1), 190–7. doi:10.1016/j.expneurol.2012.04.025

Buck, K., & Ferger, B. (2010). L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a drug discovery perspective. *Drug Discovery Today*, 15(19-20), 867–75. doi:10.1016/j.drudis.2010.08.014

Burns, K. a, & Kuan, C.-Y. (2005). Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *The European Journal of Neuroscience*, 21(3), 803–7. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03907.x

- Cadet, J. L., & Brannock, C. (1997). Invited Review Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry International*, 32(2), 117–131. doi:10.1016/S0197-0186(97)00031-4
- Cameron, H. a., & McKay, R. D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neuroscience*, 2(10), 894–7. doi:10.1038/13197
- Cavallin, M. A., Powell, K., Biju, K. C., & Fadool, D. A. (2010). State-dependent sculpting of olfactory sensory neurons is attributed to sensory enrichment, odor deprivation, and aging. *Neuroscience Letters*, 483(2), 90–5. doi:10.1016/j.neulet.2010.07.059
- Cenci, M. a, Lee, C. S., & Björklund, A. (1998). L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *The European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2694–706.
- Coronas, V., Bantubungi, K., Fombonne, J., Krantic, S., Schiffmann, S. N., & Roger, M. (2004). Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *Journal of Neurochemistry*, 91(6), 1292–301. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02823.x
- Dajas-Bailador, F., & Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(6). doi:10.1016/j.tips.2004.04.006
- Dale, H. (1914). *The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine*. *The Wellcome Physiological Research Laboratories* (pp. 147–190).
- Dani, J. A., Jenson, D., Broussard, J. I., & De Biasi, M. (2011). Neurophysiology of Nicotine Addiction. *Journal of Addiction Research & Therapy*, S1(1), 1–12. doi:10.4172/2155-6105.S1-001
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39, 889–909.
- Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*, 175(2), 303–17. doi:10.1006/exnr.2002.7891
- Diaz, J., Ridray, S., Mignon, V., Griffon, N., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (1997). Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 17(11), 4282–92.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. a, García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, *97*(6), 703–16.

Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience*, *17*(13), 5046–61.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caillé, I., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, *36*(6), 1021–34.

Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., & Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of Neuroscience*, *24*(38), 8354–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.2751-04.2004

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. a, & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, *4*(11), 1313–7. doi:10.1038/3305

Freundlieb, N., François, C., Tandé, D., Oertel, W. H., Hirsch, E. C., & Höglinger, G. U. (2006). Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *The Journal of Neuroscience*, *26*(8), 2321–5. doi:10.1523/JNEUROSCI.4859-05.2006

Frinchi, M., Di Liberto, V., Olivieri, M., Fuxe, K., Belluardo, N., & Mudò, G. (2010). FGF-2/FGFR1 neurotrophic system expression level and its basal activation do not account for the age-dependent decline of precursor cell proliferation in the subventricular zone of rat brain. *Brain Research*, *1358*, 39–45. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.083

Furuta, M., & Bridges, R. S. (2009). Effects of maternal behavior induction and pup exposure on neurogenesis in adult, virgin female rats. *Brain Research Bulletin*, *80*(6), 408–13. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.08.011

Galicía, M. B. E. (2006). Enfermedad de Parkinson. *Guías Clínicas*, *6*(23), 1–11.

García-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. a, & Alvarez-Buylla, A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Journal of Neurobiology*, *36*(2), 234–48.

Gascon, E., Dayer, A. G., Sauvain, M.-O., Potter, G., Jenny, B., De Roo, M., Zraggen, E., et al. (2006). GABA regulates dendritic growth by stabilizing

lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 26(50), 12956–66. doi:10.1523/JNEUROSCI.4508-06.2006

Gerfen, C. R. (2003). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *The Neuroscientist, Neurology and Psychiatry*, 9(6), 455–62. doi:10.1177/1073858403255839

Giasson, B. I., & Lee, V. M. (2000). A new link between pesticides and Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1227–28.

Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2009). Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells*, 27(8), 2032–43. doi:10.1002/stem.119

Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74, 363–396. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006

Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9), 482–91. doi:10.1016/j.tips.2006.07.004

Gould, E., & Gross, C. G. (2002). Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 619–23.

Gould, E., Reeves, a J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G., & Fuchs, E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 5263–7.

Gould, E., & Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry*, 46(11), 1472–9.

Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3168.

Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 67–73. doi:10.1038/35036235

Hagg, T. (2005). Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 28(11), 589–95. doi:10.1016/j.tins.2005.08.009

Hernán, M. a, Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., & Gestal-Otero, J. J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 52(3), 276–84. doi:10.1002/ana.10277

Hernán, M. a, Zhang, S. M., Rueda-DeCastro, A. M., Colditz, G. a., Speizer, F. E., & Ascherio, A. (2001). Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Annals of Neurology*, 50(6), 780–786. doi:10.1002/ana.10028

Huang, L. Z., Campos, C., Ly, J., Ivy Carroll, F., & Quik, M. (2011). Nicotinic receptor agonists decrease L-dopa-induced dyskinesias most effectively in partially lesioned parkinsonian rats. *Neuropharmacology*, 60(6), 861–8. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.032

Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caillé, I., & Hirsch, E. C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(7), 726–35. doi:10.1038/nn1265

Ichitani, Y., Okamura, H., Matsumoto, Y., Nagatsu, I., & Iyata, Y. (1991). Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Research*, 549(2), 350–3.

Jahanshahi, A., Temel, Y., Lim, L. W., Hoogland, G., & Steinbusch, H. W. M. (2011). Close communication between the subependymal serotonergic plexus and the neurogenic subventricular zone. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(4), 297–303. doi:10.1016/j.jchemneu.2011.09.001

Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Muthane, U., Dollison, A., Ferreira, M., Espinosa, A., Parsons, B., et al. (1993). Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Research*, 613(2), 347–51.

Kahlig, K. M., Binda, F., Khoshbouei, H., Blakely, R. D., McMahon, D. G., Javitch, J. a, & Galli, A. (2005). Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3495–500. doi:10.1073/pnas.0407737102

Kaplan, M. S., & Hinds, J. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092–1094. doi:10.1126/science.887941

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493–5. doi:10.1038/386493a0

Kim, W. R., Kim, Y., Eun, B., Park, O., Kim, H., Kim, K., Park, C.-H., et al. (2007). Impaired migration in the rostral migratory stream but spared olfactory function after the elimination of programmed cell death in Bax knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, 27(52), 14392–403. doi:10.1523/JNEUROSCI.3903-07.2007

- Kim, Y., Wang, W.-Z., Comte, I., Pastrana, E., Tran, P. B., Brown, J., Miller, R. J., et al. (2010). Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *Journal of Neurochemistry*, *114*(3), 750–60. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06799.x
- Kornack, D. R., & Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(10), 5768–73.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., & Gage, F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of Neuroscience*, *17*(15), 5820–9.
- Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J., & Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, *219*(4587), 979–80.
- Leif, R. C., Stein, J. H., & Zucker, R. M. (2004). A short history of the initial application of anti-5-BrdU to the detection and measurement of S phase. *Cytometry Part A*, *58*(1), 45–52. doi:10.1002/cyto.a.20012
- Lenington, J. B., Pope, S., Goodheart, A. E., Drozdowicz, L., Daniels, S. B., Salamone, J. D., & Conover, J. C. (2011). Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*, *31*(37), 13078–87. doi:10.1523/JNEUROSCI.1197-11.2011
- Lieberman, a. (2006). Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurologica Scandinavica*, *113*(1), 1–8. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00536.x
- Lledo, P.-M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(3), 179–93. doi:10.1038/nrn1867
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(5), 2074–7.
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, *264*(5162), 1145–1148. doi:10.1126/science.8178174
- Lois, C., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science*, *271*(5251), 978–81.

Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(12), 932–42. doi:10.1038/nrn983

Ma, D. K., Marchetto, M. C., Guo, J. U., Ming, G., Gage, F. H., & Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, 13(11), 1338–44. doi:10.1038/nn.2672

Maingay, M., Romero-Ramos, M., Carta, M., & Kirik, D. (2006). Ventral tegmental area dopamine neurons are resistant to human mutant alpha-synuclein overexpression. *Neurobiology of Disease*, 23(3), 522–32. doi:10.1016/j.nbd.2006.04.007

Mandairon, N., & Linster, C. (2009). Odor perception and olfactory bulb plasticity in adult mammals. *Journal of Neurophysiology*, 101(5), 2204–9. doi:10.1152/jn.00076.2009

McCarley, R. W. (2007). Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Medicine*, 8(4), 302–30. doi:10.1016/j.sleep.2007.03.005

McRitchie, D. a, Cartwright, H. R., & Halliday, G. M. (1997). Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 144(1), 202–13. doi:10.1006/exnr.1997.6418

Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), 381–4. doi:10.1126/science.1144914

Ming, G., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–50. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459

Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17980–5. doi:10.1073/pnas.0907063106

Mouret, A., Lepousez, G., Gras, J., Gabellec, M.-M., & Lledo, P.-M. (2009). Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *The Journal of Neuroscience*, 29(39), 12302–14. doi:10.1523/JNEUROSCI.3383-09.2009

Mudò, G., Belluardo, N., Mauro, A., & Fuxe, K. (2007). Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience*, 145(2), 470–83. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.012

Mudò, G., Bonomo, A., Di Liberto, V., Frinchi, M., Fuxe, K., & Belluardo, N. (2009). The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *Journal of Neural Transmission*, *116*(8), 995–1005. doi:10.1007/s00702-009-0207-z

Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, a M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, *116*(1), 201–11.

Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., & Eriksson, P. S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of Neurobiology*, *39*(4), 569–78.

Nottebohm, F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *457*(2), 143–61.

O’Keeffe, G. C., Barker, R. A., & Caldwell, M. A. (2009). Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle*, *8*(18), 2888–2894.

O’Keeffe, G. C., Tyers, P., Aarsland, D., Dalley, J. W., Barker, R. a, & Caldwell, M. a. (2009). Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(21), 8754–9. doi:10.1073/pnas.0803955106

Park, H. J., Lee, P. H., Ahn, Y. W., Choi, Y. J., Lee, G., Lee, D.-Y., Chung, E. S., et al. (2007). Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(1), 79–89. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05636.x

Parkinson, J. (1817). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *14*(2), 223–36; discussion 222.

Paton, J. a, O’Loughlin, B. E., & Nottebohm, F. (1985). Cells born in adult canary forebrain are local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, *5*(11), 3088–93.

Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Third., p. 286). Academic Press.

Peng, J., Xie, L., Jin, K., Greenberg, D. A., & Andersen, J. K. (2008). Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson’s disease. *Neuroscience*, *153*(3), 664–70. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.063

Perez, X. A., Bordia, T., McIntosh, M., & Quik, M. (2010). $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic receptors both regulate dopamine signaling with increased nigrostriatal damage: relevance to Parkinson’s disease. *Molecular Pharmacology*, *78*(5), 971–80. doi:10.1124/mol.110.067561

- Perry, D. C., Mao, D., Gold, A. B., McIntosh, M., Pezzullo, J. C., & Kellar, K. J. (2007). Chronic nicotine differentially regulates alpha6- and beta3-containing nicotinic cholinergic receptors in rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 306–15. doi:10.1124/jpet.107.121228
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116–29. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.036
- Pillon, B., Ertle, S., Deweer, B., Bonnet, a M., Vidailhet, M., & Dubois, B. (1997). Memory for spatial location in “de novo” parkinsonian patients. *Neuropsychologia*, 35(3), 221–8.
- Platel, J.-C., Stamboulian, S., Nguyen, I., & Bordey, A. (2010). Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 60–71. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.02.004
- Poewe, W., Antonini, A., Zijlmans, J., Burkhard, P., & Vingerhoets, F. (2010). Levodopa in the treatment of Parkinson’s disease: an old drug still going strong. *Clinical Interventions in Aging*, 229. doi:10.2147/CIA.S6456
- Quik, M., Cox, H., Parameswaran, N., O’Leary, K., Langston, J. W., & Di Monte, D. (2007). Nicotine reduces levodopa-induced dyskinesias in lesioned monkeys. *Annals of Neurology*, 62(6), 588–96. doi:10.1002/ana.21203
- Quik, M., Huang, L. Z., Parameswaran, N., Bordia, T., Campos, C., & Perez, X. a. (2009). Multiple roles for nicotine in Parkinson’s disease. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 677–85. doi:10.1016/j.bcp.2009.05.003
- Quik, M., O’Leary, K., & Tanner, C. M. (2008). Nicotine and Parkinson’s disease: implications for therapy. *Movement Disorders*, 23(12), 1641–52. doi:10.1002/mds.21900
- Quik, M., Perez, X. a, & Bordia, T. (2012). Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson’s disease. *Movement Disorders*, 27(8), 947–957. doi:10.1002/mds.25028
- Rakic, P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227(4690), 1054–1056. doi:10.1126/science.3975601
- Reuss, B., & Von Bohlen und Halbach, O. (2003). Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 313(2), 139–57. doi:10.1007/s00441-003-0756-7
- Rice, M. E., Patel, J. C., & Cragg, S. J. (2011). Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience*, 198, 112–37. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.066

Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., & Lledo, P.-M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience*, *22*(7), 2679–89. doi:20026260

Rochefort, C., & Lledo, P.-M. (2005). Short-term survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment. *The European Journal of Neuroscience*, *22*(11), 2863–70. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04486.x

Rothwell, J. C. (2011). The motor functions of the basal ganglia. *Journal of Integrative Neuroscience*, *10*(3), 303. doi:10.1142/S0219635211002798

Rubin, B. P. (2009). Changing Brains: The Emergence of the Field of Adult Neurogenesis. *BioSocieties*, *4*(4), 407–424. doi:10.1017/S1745855209990330

Ryan, R. E., Ross, S. A., Drago, J., & Loiacono, R. E. (2001). Dose-related neuroprotective effects of chronic nicotine in 6-hydroxydopamine treated rats, and loss of neuroprotection in alpha4 nicotinic receptor subunit knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, *132*(8), 1650–6. doi:10.1038/sj.bjp.0703989

Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2011). Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(20), 8479–84. doi:10.1073/pnas.1018782108

Scoville, W., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *20*(1), 11–21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11

Seidl, S. E., & Potashkin, J. a. (2011). The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, *2*(November), 68. doi:10.3389/fneur.2011.00068

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J. C., et al. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, *299*(5603), 117–20. doi:10.1126/science.1076647

Shruster, A., Melamed, E., & Offen, D. (2010). Neurogenesis in the aged and neurodegenerative brain. *Apoptosis*, *15*(11), 1415–21. doi:10.1007/s10495-010-0491-y

Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, *11*(3-4), 151–167. doi:10.1007/BF03033565

Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of Neuroscience*, *25*(1), 10–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005

Sui, Y., Horne, M. K., & Stanić, D. (2012). Reduced proliferation in the adult mouse subventricular zone increases survival of olfactory bulb interneurons. *PloS one*, *7*(2), e31549. doi:10.1371/journal.pone.0031549

Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, a J., & Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *The Journal of Neuroscience*, *19*(14), 5792–801.

Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, *53*(1), 198–214. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.08.002

Thomas, B., & Beal, M. F. (2007). Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, *16 Spec No*(2), R183–94. doi:10.1093/hmg/ddm159

Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., & Menini, A. (2009). From pheromones to behavior. *Physiological Reviews*, *89*(3), 921–56. doi:10.1152/physrev.00037.2008

Tissingh, G., Berendse, H., & Bergmans, P. (2001). Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Movement*, *16*(1), 41–46.

Toulouse, A., & Sullivan, A. M. (2008). Progress in Parkinson's disease-where do we stand? *Progress in Neurobiology*, *85*(4), 376–92. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.05.003

Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, *5*(1), 107–110. doi:10.1016/0014-2999(68)90164-7

Van den Berge, S. a, Van Strien, M. E., Korecka, J. a, Dijkstra, A. a, Sluijs, J. a, Kooijman, L., Eggers, R., et al. (2011). The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain*, *134*(Pt 11), 3249–63. doi:10.1093/brain/awr256

Van Kampen, J. M., Hagg, T., & Robertson, H. A. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *The European Journal of Neuroscience*, *19*(9), 2377–87. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03342.x

Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(23), 13427–31.

Visanji, N. P., Mitchell, S. N., O'Neill, M. J., & Duty, S. (2006). Chronic pre-treatment with nicotine enhances nicotine-evoked striatal dopamine release and alpha6 and beta3 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuropharmacology*, *50*(1), 36–46. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.07.013

Wilk, J. B., & Lash, T. L. (2007). Risk factor studies of age-at-onset in a sample ascertained for Parkinson disease affected sibling pairs: a cautionary tale. *Emerging Themes in Epidemiology*, *4*, 1. doi:10.1186/1742-7622-4-1

Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J., & Kuhn, H. G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, *16*(9), 1681–1689. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02238.x

Winner, B., Geyer, M., Couillard-Després, S., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, H. G., et al. (2006). Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Experimental Neurology*, *197*(1), 113–21. doi:10.1016/j.expneurol.2005.08.028

Xiao, C., Nashmi, R., McKinney, S., Cai, H., McIntosh, M., & Lester, H. A. (2009). Chronic nicotine selectively enhances alpha4beta2* nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal dopamine pathway. *The Journal of Neuroscience*, *29*(40), 12428–39. doi:10.1523/JNEUROSCI.2939-09.2009

Zhao-Shea, R., Liu, L., Soll, L. G., Improgo, M. R., Meyers, E. E., McIntosh, M., Grady, S. R., et al. (2011). Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology*, *36*(5), 1021–32. doi:10.1038/npp.2010.240

