



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Neurotoxicidad inducida por el inicio temprano en el consumo de cocaína en el hipocampo de rata

Patricia Homar Ruano

Grado en Bioquímica

Año académico 2013-14

DNI de la alumna: 43196943E

Trabajo tutelado por M^a Julia García Fuster

Departamento de Biología

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Palabras clave del trabajo:

Adicción, cocaína, hipocampo, giro dentado, neurogénesis, proliferación celular, Ki-67

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	4
1.1	La adicción a drogas de abuso y factores de riesgo	4
1.2	La formación hipocampal	5
1.2.1	Neurogénesis postnatal.....	7
1.3	La cocaína	9
1.2.1	Efectos agudos inducidos por el consumo de cocaína.....	10
1.2.2	Efectos a largo plazo inducidos por el consumo de cocaína	11
2	OBJETIVOS	12
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1	Animales de experimentación.....	12
3.2	Diseño experimental	12
3.3	Obtención del tejido.....	13
3.4	Análisis Inmunohistoquímico	13
3.5	Cuantificación.....	14
3.6	Análisis estadístico	15
4	RESULTADOS.....	15
4.1	Análisis de la proliferación celular basal	15
4.2	Análisis del efecto de la administración crónica de cocaína	16
5	DISCUSIÓN.....	18
6	CONCLUSIONES	22
7	BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

Introducción: La adicción a drogas de abuso es un trastorno crónico caracterizado por una conducta compulsiva de búsqueda y autoadministración de la droga y la pérdida de control de consumo. Uno de los principales factores de riesgo a la hora de desarrollar una adicción es el inicio temprano del consumo, siendo la adolescencia una etapa de gran vulnerabilidad. La neurogénesis es un proceso por el cual se generan neuronas nuevas a lo largo de toda la vida en el giro dentado del hipocampo, una estructura implicada en el desarrollo de la memoria y el aprendizaje que se relaciona directamente con el desarrollo de la adicción. La cocaína es un estimulante del SNC cuyo consumo está ampliamente extendido. El abuso de cocaína implica diversos efectos agudos relacionados con su capacidad para inhibir la recaptación de dopamina en el sistema límbico, así como efectos a largo plazo los cuales implican neuroadaptaciones en distintas regiones cerebrales como es el hipocampo, afectando negativamente al proceso neurogénico en esta región. **Materiales y métodos:** Se utilizaron ratas Sprague-Dawley como modelo de tres estadios de adolescencia y edad adulta para realizar un estudio de las diferencias basales en la proliferación celular entre ambas etapas. Así como tres grupos adolescentes tratados o no de manera crónica con cocaína (15 mg/Kg i.p) para el análisis del efecto de la droga en la proliferación celular. Se extrajeron los cerebros y se seccionaron para el posterior análisis inmunohistoquímico del marcador endógeno de proliferación celular Ki-67. Las células Ki-67+ se cuantificaron utilizando un microscopio óptico con objetivo 63X. **Resultados y discusión:** Se observó un pico máximo de proliferación celular basal durante la adolescencia media respecto a la edad adulta como evidencia la literatura. La cocaína indujo un efecto diferencial entre los grupos; provocando un aumento de la proliferación celular durante la adolescencia temprana, y una disminución de la proliferación durante la adolescencia media. No se observó ningún efecto durante la adolescencia media. Probablemente debido a las diferencias en los índices de proliferación entre los grupos.

ABSTRACT

Introduction: Drug addiction is a chronic disorder characterized by a compulsion to seek and take drugs and loss of control in intake. Early onset of drug consumption is one of the major risk factors to develop an addiction and adolescence is a vulnerability stage. New neurons are generated during lifetime in the dentate gyrus of the hippocampus. The hippocampus is a structure involved in memory development and learning related with addiction progress. Cocaine is a CNS stimulant whose consumption is very common. Different acute effects are associated with cocaine abuse, these effects are related with the cocaine ability to inhibit dopamine reuptake in limbic system. Cocaine abuse causes neuroadaptations in some brain regions like hippocampus, impairing the neurogenic process. **Materials and methods:** Sprague-Dawley rats were used as model for three adolescent stages and adulthood to analyze basal cellular proliferation in both stages. Moreover three adolescent groups were used to determine the effect of chronic cocaine exposure (15 mg/kg i.p) on cell proliferation. Brains were removed and sectioned to perform the immunohistochemistry study of Ki-67, cell proliferation endogenous marker. Ki-67+ cells were quantified at 63X magnification under light microscope. **Results and discussion:** As reported in other studies, there was a cell proliferation peak during middle adolescence compared to adulthood. Cocaine produced different effects in all the groups; there was an increased cell proliferation during early adolescence in contrast with middle adolescence in which cell proliferation significantly decreased. There was no effect on late adolescence. These differences are probably due to the different proliferation index among groups.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La adicción a drogas de abuso y factores de riesgo

La adicción a drogas de abuso es un trastorno crónico caracterizado por una conducta compulsiva de búsqueda y autoadministración de la droga, la pérdida de control en la limitación del consumo y la aparición de estados de ánimo asociados a la abstinencia cuando se priva del consumo de la sustancia en cuestión (Koob and Volkow, 2010). Estos trastornos implican un grave problema para la salud, la economía y el bienestar de la sociedad por lo que son un gran objeto de estudio y se intenta conocer mejor los mecanismos implicados para poder desarrollar nuevos tratamientos para las adicciones y disminuir así las recaídas.

Cabe destacar que a la hora de desarrollar una adicción además del consumo de la droga en sí, existen diversas diferencias individuales a las que se pueden atribuir unas probabilidades mayores o menores de sufrirla, ya que un elevado número de personas están en contacto con sustancias adictivas, pero solo una pequeña parte de estos individuos llegan a desarrollar una adicción. Estas diferencias individuales se relacionan también con las distintas respuestas a algunos de los tratamientos farmacológicos desarrollados para tratar el abuso de diferentes drogas en distintos sujetos adictos, y se asocian a distintos factores de riesgo como son la propensión genética o algunos factores ambientales y sociales como el ambiente familiar, la disponibilidad de drogas o la edad (Redolar Ripoll, 2008), que atribuirían una cierta propensión o vulnerabilidad a sufrir una adicción.

Respecto a la edad como factor de riesgo en el progreso de la adicción, se cree que cuanto antes se inicie el consumo de una droga el riesgo de desarrollar una adicción es mayor (Spear, 2000). La adolescencia es un periodo de desarrollo tanto en animales como en humanos en el cual se produce, en distintos tiempos según la especie, la maduración completa del cerebro hacia la edad adulta (Kelley et al., 2004). Así el proceso de adolescencia representa una etapa de gran vulnerabilidad neurobiológica y conductual debido a las adaptaciones cerebrales que se dan durante esta etapa.

El período de adolescencia, a pesar de existir grandes diferencias individuales en función del ambiente, género, etc. se considera que, en humanos, abarca entre los 12 y 18 años. En ratas esta cronología equivale al periodo comprendido entre los días 28 y 42 tras el nacimiento (Spear, 2007). Durante el estado de transición se dan una serie de comportamientos caracterizados por un aumento de la conducta de riesgo e impulsiva, búsqueda de nuevas experiencias, etc. Generalmente se asocia este comportamiento al incremento de los niveles de hormonas que se da durante la

pubertad (maduración sexual), sin embargo muy probablemente esté más relacionado con los procesos de desarrollo que se dan en el cerebro durante la adolescencia (Spear, 2000, 2007). En concreto, el desarrollo de las estructuras y sistemas de motivación, recompensa y toma de decisiones (sistema límbico) (Chambers et al., 2003), sistemas que se encuentran muy relacionados con los procesos de adicción. Por lo que se cree que la adolescencia es un periodo de riesgo y vulnerabilidad para la destrucción de estructuras cerebrales (Crews et al., 2007) como las causadas por drogas de abuso.

Las principales estructuras remodeladas durante esta etapa son la corteza prefrontal (PFC) y los sistemas de recompensa del sistema límbico, principalmente los sistemas dopaminérgicos, regiones como la amígdala, el hipocampo y el núcleo accumbens (NAc), entre otras (Crews et al., 2007, Spear, 2011) regiones que se encuentran muy relacionadas con el efecto de las drogas de abuso. En la PFC se produce durante la adolescencia un proceso conocido como “poda” sináptica, donde se destruyen hasta el 50% conexiones sinápticas (Spear, 2007). Esta región se encarga de la toma de decisiones y de los juicios morales, por lo que la falta de desarrollo es una traba en la adolescencia para tomar decisiones acertadas. Este proceso de “poda” se asocia con la adquisición del control del comportamiento (Romer, 2010), por lo que antes de que culmine los adolescentes tienden a ser más impulsivos, lo que les atribuye un mayor riesgo a la hora de iniciarse al consumo de drogas. En el hipocampo, amígdala y NAc también se produce dicha pérdida sináptica, de manera que las conexiones de la PFC con el resto de estructuras se podrían considerar ineficientes para llevar a cabo el control del comportamiento durante esta etapa (Romer, 2010). Además de las alteraciones que se producen en las distintas regiones del sistema mesolímbico, también se producen cambios directamente sobre la producción de dopamina (DA) (Spear, 2007), un neurotransmisor encargado de los sistemas de recompensa. Por ello se postula la posibilidad de un desajuste en el sistema de recompensa dopaminérgico, de manera que hay una sobreproducción de DA, que produce una sobredosis en la PFC lo que implica que la DA sobreproducida restante actuaría sobre las estructuras subcorticales como el NAc (Spear, 2011). Esto generaría una mayor recompensa en respuesta a la administración de la droga durante esta etapa del desarrollo, por lo que podría estar relacionado con la vulnerabilidad a desarrollar una adicción.

1.2 La formación hipocampal

El hipocampo es una región allocortical organizada en 3 capas plegadas que deriva de palio medial de la vesícula telencefálica, situado en la superficie medial del lóbulo temporal (Puelles, 2008). Está formado por el hipocampo propiamente dicho y el giro dentado (DG) separados por la

cisura hipocámpica y el complejo subicular que juntamente con la corteza entorrinal conforman el sistema funcional conocido como formación hipocámpica (Figura 1) (Andersen, 2007). La formación hipocámpica tiene como función principal la consolidación de la memoria y del aprendizaje, así como la representación espacial. Dicha participación en el aprendizaje está siendo ampliamente estudiada por su implicación en las adicciones a drogas de abuso en general y a la cocaína en particular.

El hipocampo propiamente dicho, también conocido como Cuerno de Ammón (CA) se divide en tres capas. La capa principal está formada por células piramidales y consta de tres subdivisiones (CA3, CA2 y CA1) (Figura 1) (Alcaraz, 2001, Andersen, 2007, Dvorkin et al., 2010). Según la terminología aplicada por Lorente de Nó (Andersen, 2007), estas divisiones se distinguen según el tamaño y densidad de las células piramidales que conforman cada una de las regiones, así la zona CA1 más distal está formada por células piramidales de menor tamaño, mientras que las zonas CA2 y CA3 las conforman células piramidales de mayor tamaño. La segunda capa, conocida como capa polimórfica está formada por las dendritas de las células piramidales, mientras que la tercera y última capa está formada por la parte más distal de dichas dendritas formando la capa molecular (Alcaraz, 2001, Andersen, 2007).

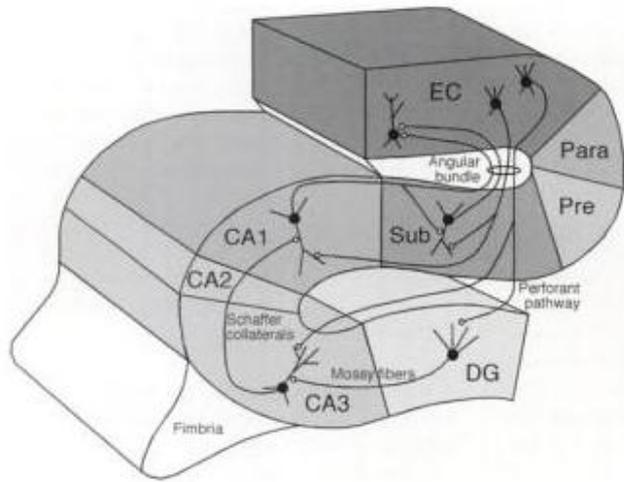


Figura 1: Representación esquemática de la formación hipocámpica. Imagen ilustrativa en la que se muestran las estructuras que integran la formación hipocámpica y sus capas. (Andersen, 2007)

El subículo, el presubículo y el parasubículo componen el complejo subicular (Figura 1). El subículo es adyacente a la región CA1 del hipocampo y la corteza entorrinal, está formado por células piramidales y es la región principal de proyecciones eferentes desde el hipocampo, que a su vez recibe proyecciones de la corteza entorrinal entre otros. El presubículo, parasubículo y la corteza entorrinal presentan una organización en 6 capas corticales, conectadas con distintas regiones. La función principal de la corteza entorrinal es la de servir de conexión entre el hipocampo y el neocórtex (Andersen, 2007). La mayor parte de las aferencias dirigidas al hipocampo llegan desde esta región (Alcaraz, 2001).

El DG está situado en una posición medial al hipocampo y representa la parte más medial de la corteza cerebral (Nieuwenhuys et al., 2009). Se trata de una estructura cortical formada por tres

capas: la capa molecular, que contiene pocas células, la conforman las dendritas de las células granulosas y polimórficas de las capas adyacentes; la capa principal es la granular, formada por células granulosas. Los axones de estas células atraviesan el hilio hasta el CA conformando fibras musgosas. Y finalmente el hilio (o capa polimorfa), formada por un gran número distinto de células (Andersen, 2007, Nieuwenhuys et al., 2009). Entre las dos últimas capas se encuentra la zona subgranular, siendo el objeto de estudio de este trabajo ya que está formada por precursores neurales, capaces de llevar a cabo la nueva proliferación de células y finalmente la generación de neuronas, proceso conocido como neurogénesis (véase apartado siguiente) durante toda la vida (Altman and Das, 1966, Arias-Carrión et al., 2007) y se cree podría estar involucrado en los procesos adictivos (Mandyam & Koob, 2012).

1.2.1 Neurogénesis postnatal

La neurogénesis es un proceso de plasticidad neuronal mediante el que, a partir de células precursoras, se generan neuronas maduras (Abrous et al., 2005). Existen dos regiones cerebrales principales en las que se produce la neurogénesis; éstas son la zona subventricular (SVZ) del bulbo olfatorio y la zona subgranular (SGZ) del DG del hipocampo. La existencia de este proceso en dichas regiones fue demostrado en ratas inicialmente por Altman y Das (1966) mediante los estudios de autoradografía con timidina tritiada (Altman and Das, 1966) y posteriores estudios demostraron que la neurogénesis postnatal se daba también en monos y humanos (Eriksson et al., 1998, Kornack and Rakic, 1999).

Las funciones específicas de la neurogénesis en el DG no se conocen, sin embargo se cree que puede estar implicada en el aprendizaje y en la adaptación a situaciones nuevas, sobre todo durante la adolescencia (Crews et al., 2007). Se ha visto que el índice neurogénico es más elevado en adolescentes que en la edad adulta (Kuhn et al., 1996, He and Crews, 2007), por lo que podría estar implicada en la maduración cerebral. En este trabajo se utiliza como modelo la rata (Sprague-Dawley) para determinar las diferencias en la etapa inicial de la neurogénesis (proliferación celular) del SGZ del DG del hipocampo entre adolescentes y adultos y el efecto de la cocaína durante la adolescencia en dichas etapas. Por lo que en este apartado se explicará brevemente el proceso de proliferación celular y neurogénesis en esta región.

El proceso neurogénico implica distintas etapas entre las que se encuentran la proliferación celular, diferenciación, migración y finalmente la maduración e integración de las neuronas (Figura 2).

En la SGZ del DG del hipocampo se encuentran las células progenitoras multipotentes o células tipo 1, se trata de células tipo astrocito radial (Arias-Carrión et al., 2007). Estas células al proliferar dan lugar a precursores intermediarios conocidos como células tipo 2 que expresan marcadores tanto gliales como neuronales, es decir, son capaces de dar lugar tanto a neuronas granulares como a células gliales. Las células tipo 3 se consideran un estado de transición entre los neuroblastos y la siguiente etapa de neurona postmitótica inmadura. En este estadio las células que expresan únicamente marcadores de tipo neuronal migran hacia la capa granular de DG, y es en este momento cuando se produce la salida del ciclo celular. Las células se diferencian entonces en células granulares inmaduras, momento en el que se produce una nueva migración en la capa granular del DG y se da la maduración de las neuronas. Finalmente, éstas se integran en la capa granular y establecen conexiones sinápticas extendiendo sus axones hasta la región CA3 del cuerno de Ammón.

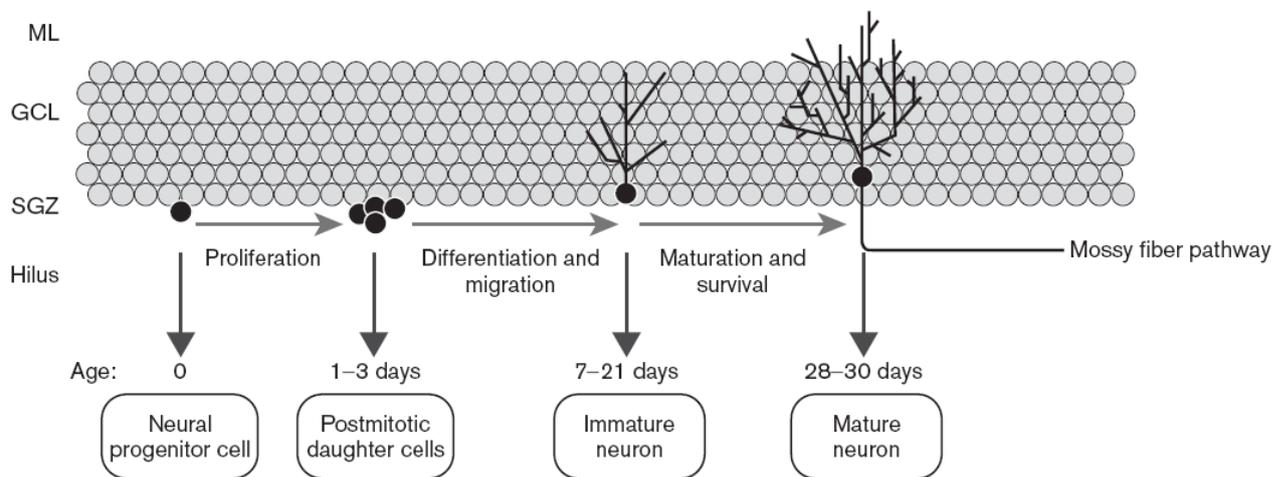


Figura 2: Etapas de la neurogénesis del giro dentado del hipocampo. Se muestra la proliferación, migración e integración de las células progenitoras en la capa subgranular (SGZ) hasta la capa granular (GCL) del giro dentado donde se integrarán para formar neuronas maduras. (Schmidt and Duman, 2007)

Existen distintos marcadores tanto endógenos como exógenos para llevar a cabo el estudio y determinación de la tasa neurogénica y sus distintas etapas (von Bohlen, 2011). En este trabajo se analiza la proliferación celular en el DG mediante el marcaje inmunohistoquímico de Ki-67, uno de los marcadores más utilizados para el estudio de la proliferación celular.

El antígeno Ki-67 fue identificado el 1983 por Gerdes y colaboradores quienes descubrieron que se expresaba únicamente en las células en estado proliferativo (Gerdes et al., 1983, Kee et al., 2002). El Ki-67 es un marcador endógeno de proliferación celular, este al ser endógeno ofrece la ventaja de no provocar ninguno de los efectos adversos que pueden ir asociados a la administración de marcadores exógenos como el desarrollo de tumores (Kee et al., 2002). Se trata de una proteína nuclear que se expresa intrínsecamente en todas las fases del ciclo celular, excepto durante G_0 y el

inicio de G_1 (Kee et al., 2002). Esta proteína puede ser marcada mediante análisis inmunohistoquímico para a continuación llevar a cabo la cuantificación de las células en división tanto para el estudio de la proliferación celular como en tumores.

1.3 La cocaína

La cocaína o benzoil-metil-ecgonina ($C_{17}H_{21}NO_4$) (Figura 3) es un alcaloide natural que se obtiene de las hojas del arbusto *Erythroxylum coca* típicamente cultivado en los Andes en América del Sur. Fue utilizada inicialmente a modo de pago en el Imperio Inca y posteriormente con fines terapéuticos como anestésico local, o como tratamiento de la ansiedad, entre otros. Desde el siglo XX ha adquirido un papel central como un estimulante del sistema nervioso central y su uso como droga de abuso está ampliamente extendido.

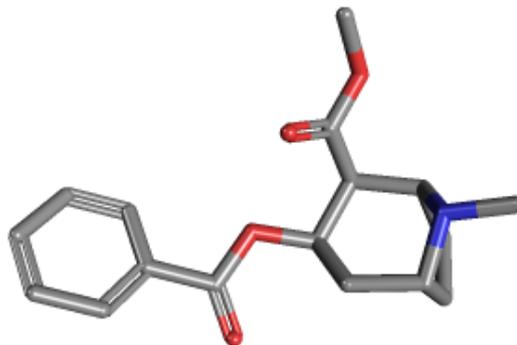


Figura 3: Estructura de la cocaína vista en tres dimensiones. Imagen obtenida de (PubChem Compound)

Normalmente se produce como clorhidrato de cocaína, que se obtiene al mezclar el alcaloide obtenido de la planta con ácido hidroclorehídrico, formándose una sal soluble en agua fácilmente absorbida por las mucosas. Se forma un polvo blanco que se suele autoadministrar por aspiración nasal aunque también se administra oralmente o de forma intravenosa una vez disuelto en agua (Caballero Martínez, 2005, EMCDDA, 2013).

La cocaína provoca una elevada estimulación del sistema nervioso, con las subsecuentes implicaciones psicológicas como son la sensación de euforia y agudeza mental, pérdida del apetito, ansiedad, disminución del sueño, entre otras (Caballero Martínez, 2005). Dicha acción estimulante se da por la acción de esta droga sobre diversos sistemas de neurotransmisión como la serotonina y la noradrenalina y principalmente sobre la DA (Nestler, 2005). La cocaína incrementa la cantidad de DA en el espacio sináptico impidiendo su recaptación (Ritz et al., 1987, Nestler, 2001), afectando así a los sistemas de recompensa del sistema límbico (véase apartado siguiente), proceso relacionado con el ansia de consumir de nuevo. Los efectos que provoca la cocaína a largo plazo para desencadenar los procesos de adicción y el gran riesgo de recaídas asociados a estos están siendo ampliamente estudiados.

1.2.1 Efectos agudos inducidos por el consumo de cocaína

La mayoría de estudios científicos que abordan las adicciones se centran en el estudio de los diversos receptores implicados en el mecanismo de acción de cada tipo de droga de abuso en función de su estructura, así como en el efecto neurobiológico que tienen las drogas sobre los sistemas de recompensa en el cerebro, ya que la mayor parte de las drogas de abuso, incluida la cocaína, provocan una activación aguda de la vía mesolímbica dopaminérgica produciendo un incremento de la concentración de DA en el espacio sináptico, un hecho clave en los sistemas agudos de refuerzo (Koob et al., 1994). Este sistema límbico de recompensa se encuentra situado en la parte anterior del cerebro y lo conforman un conjunto de neuronas que conectan diversas regiones del cerebro. El sistema se inicia en el área tegmental ventral (ATV) formado por cuerpos neuronales capaces de liberar DA, las eferencias de esta estructura llegan hasta el NAc donde se encuentran los receptores de DA excitatorios e inhibitorios (D1 y D2 respectivamente) y es la región que genera el placer, así como a la CPF (Figura 2) (Robbins and Everitt, 2002, Arias-Carrión et al., 2010). Otras estructuras límbicas también están relacionadas con la recompensa, como por ejemplo la amígdala, que es una estructura implicada en el procesamiento emocional (sensaciones agradables o desagradables), o el hipocampo, una región del cerebro relacionada con el aprendizaje y la memoria de las sensaciones, así como con la sensación de recompensa relacionada con el consumo de la droga (Robbins and Everitt, 2002).

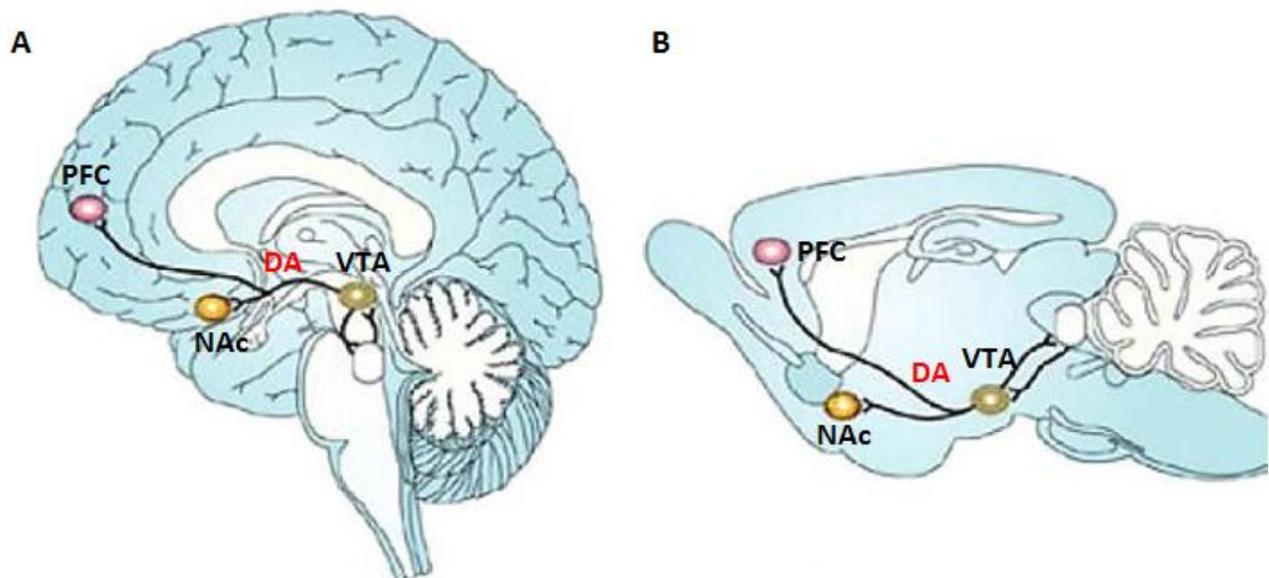


Figura 4: Representación de las estructuras implicadas en el sistema de recompensa dopaminérgico. Se ilustran las principales proyecciones de DA desde el VTA hasta la PFC y el NAc en el cerebro humano (A) y de rata (B). Imagen adaptada de (Henningfield et al., 2009).

Así, la capacidad de la cocaína para provocar los efectos de euforia, placer y pérdida de control radican en el efecto que tiene sobre dicho sistema de recompensa en el sistema límbico. Como se ha explicado, el ATV libera la DA y la cocaína, al ser un agonista indirecto de este sistema de neurotransmisión bloquea la unión a sus transportadores, impidiendo así su recaptación (Nestler, 2001), de este modo la DA se acumula en el espacio sináptico y al interactuar con las células del NAc genera el estado de placer característico de la administración aguda de cocaína (Koob et al., 1994, Nestler, 2005). Cabe destacar que la cocaína, además de impedir la captación de DA, tiene el mismo efecto sobre la captación en sistemas no dopaminérgicos como son la noradrenalina y la serotonina, lo que se asocia con el aumento de la presión arterial y con las modificaciones del apetito respectivamente, aunque en general se consideran más importantes los efectos de la cocaína sobre el sistema dopaminérgico (Callado, 2001).

1.2.2 Efectos a largo plazo inducidos por el consumo de cocaína

Los efectos agudos inducidos por la cocaína no son suficientes para explicar el desarrollo y el mantenimiento de una adicción, ya que se ha observado que los efectos sobre los sistemas de recompensa, en concreto la liberación de DA, se da tanto en sujetos adictos como en sujetos no adictos después de la administración aguda de cocaína (Goldstein and Volkow, 2002). Parece ser que los procesos de adicción provocan alteraciones en la plasticidad neuronal, neuroadaptaciones a largo plazo que afectan principalmente a los circuitos implicados en la memoria y en el aprendizaje del sistema límbico tras el consumo crónico de drogas (Nestler, 2001, Koob and Volkow, 2010). Las regiones principales asociadas a estas adaptaciones tras el consumo prolongado de cocaína son el NAc, el hipocampo y la PFC. Se ha visto que la PFC sufre cambios estructurales durante el abuso crónico de cocaína implicados en el deterioro de la memoria así como en la pérdida de la capacidad de inhibir los impulsos, lo que estaría íntimamente relacionado con la conducta compulsiva característica de los drogodependientes y las recaídas (George et al., 2008, Koob and Volkow, 2010). Asimismo, se ha visto que la estructura de las células nerviosas tanto del NAc como de la PFC se ven afectadas por el consumo de drogas a largo plazo, incrementando el número y la densidad de las dendritas, hecho que puede afectar a la eficacia sináptica alterando el efecto de los neurotransmisores (Robinson et al., 2001). El hipocampo es una estructura de gran interés, ya que además de su función como centro de memoria, por su posición anatómica está muy relacionado con los sistemas de recompensa (ATV y NAc) (Nestler, 2005, Sudai et al., 2011), por lo que los cambios en su estructura e índices de plasticidad neuronal podrían estar muy relacionados con el desarrollo y mantenimiento de la adicción, ya que se ha demostrado que la administración crónica de cocaína (Yamaguchi et al., 2004) y la abstinencia (García-Fuster et al., 2011) en roedores adultos disminuye la

neurogénesis en el DG del hipocampo y que ésta es altamente vulnerable a los efectos del alcohol tanto en roedores (Crews et al., 2006) como en primates no humanos (Taffe et al., 2010). Estos cambios en la plasticidad neuronal, como se ha explicado anteriormente, podrían estar relacionados con el desarrollo del proceso de adicción así como en los procesos de recaída (Mandyam and Koob, 2012).

2 OBJETIVOS

Este trabajo tenía dos objetivos principales, el primero era identificar las diferencias basales en la tasa de proliferación celular del DG del hipocampo de rata entre las distintas etapas de adolescencia (temprana, media y tardía) y la edad adulta. El segundo objetivo fue determinar el efecto de la administración crónica de cocaína a distintos tiempos de adolescencia (temprana, media y tardía) en la proliferación celular del DG del hipocampo de rata.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Para la realización de este estudio se utilizaron 36 ratas macho Sprague-Dawley (Charles-River, L'Ambresie Cedex, Francia). Tras cuatro días en cuarentena en el estabulario, las ratas se mantuvieron durante todo el estudio en condiciones ambientales controladas (20-22°C de temperatura, 50-60% de humedad), en ciclos de luz-oscuridad de 12 h, y con bebida y comida disponible *ab libitum*. Todos los procesos experimentales se llevaron a cabo siguiendo las directrices éticas establecidas por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de las Islas Baleares (CEEA).

3.2 Diseño experimental

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo preliminar de este trabajo fue cuantificar los índices basales de nueva proliferación celular en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley durante los distintos estadios de la adolescencia y en comparación con la rata adulta. Posteriormente, se determinó el efecto del consumo crónico de cocaína sobre los índices de nueva proliferación celular en el hipocampo durante distintos estadios de la adolescencia (véase Tabla 1). El análisis de la

proliferación celular se realizó mediante la cuantificación inmunohistoquímica del marcador endógeno de proliferación celular Ki-67 (Gerdes et al., 1983).

Para determinar la proliferación celular basal en el hipocampo durante la adolescencia se compararon los grupos control detallados en la tabla 1 (salino, 1 ml/kg, i.p.) con la rata adulta (PND 60). Para el estudio del efecto de la administración de cocaína durante los distintos estadios de la adolescencia en la proliferación hipocampal se administró de manera crónica cocaína durante 7 días (15 mg/kg, i.p.) y se comparó con su grupo control respectivo (Tabla 1).

Tabla 1: Diseño experimental y tratamiento administrado a cada grupo. PND= post natal day

PND	33 34 35 36 37 38 39	40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54	55 56 57 58 59 60	Rat ID		
Adolescencia temprana	Salino (1ml/kg i.p.)	Sacrificio			N=5	
	Cocaína (15mg/kg i.p.)				N=5	
Adolescencia media		Salino (1ml/kg i.p.)	Sacrificio		N=5	
		Cocaína (15mg/kg i.p.)			N=5	
Adolescencia tardía			Salino (1ml/kg i.p.)	Sacrificio		N=5
			Cocaína (15mg/kg i.p.)			N=5
Adulto control				Sacrificio	N=6	

3.3 Obtención del tejido

Las ratas se sacrificaron 24 h después de la última dosis de salino o cocaína (PND 40, 47, 54) para las ratas adolescentes o en PND 60 para las ratas adultas mediante decapitación para llevar a cabo la extracción del cerebro. El hemisferio izquierdo del cerebro se diseccionó y se congeló rápidamente a -30°C en isopentano. Luego se almacenó a -80°C para su posterior procesamiento. La región hipocampal (-1.64 a -5.96 mm de Bregma (Paxinos and Watson, 2007)) se seccionó a un grosor de 30 μm a -20°C mediante la utilización de un criostato (Leica CM1850 UV). Las secciones del hipocampo se montaron en portas y se almacenaron de nuevo a -80°C para llevar a cabo el posterior estudio inmunohistoquímico (marcaje con Ki-67).

3.4 Análisis Inmunohistoquímico

Con el fin de llevar a cabo la determinación de la proliferación celular en el DG del hipocampo se realizó un marcaje inmunohistoquímico de Ki-67, un marcador que como se ha mencionado en la introducción se expresa de manera intrínseca durante la división celular (Kee et al., 2002). Para ello, el tejido se fijó durante una hora en paraformaldehído (PFA) al 4%. Tras un lavado rápido utilizando

tampón fosfato (PBS), las secciones se incubaron durante 1 hora en citrato de sodio al 10%, pH 6.0 en un baño de agua precalentado a 90°C. Posteriormente, las secciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente en el mismo tampón durante aproximadamente 20 minutos y tras lavados en PBS, y con el objetivo de inhibir la peroxidasa, se incubaron durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 0.3%. Las secciones se bloquearon durante 1 hora mediante la adición de albúmina de suero bovino con un 2% de suero de cabra. A continuación, las secciones se incubaron en el anticuerpo primario policlonal de conejo anti Ki-67 (dilución 1:40.000) durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se realizaron diversos lavados con PBS con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario, y a continuación las secciones se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (dilución 1:1000). Posteriormente, el anticuerpo secundario se retiró para incorporar el complejo avidina-biotina (dilución 1:1000) que se incubó durante 1 hora. Después se incorporó el cromógeno diaminobencidina (DAB) durante 6 minutos para marcar las células Ki-67 positivas. La reacción del DAB se detuvo mediante la adición de PBS tras la que se realizaron algunos lavados en agua. Finalmente, se llevó a cabo la tinción nuclear de las secciones con cresil violeta y tras la deshidratación de las mismas en baños de alcohol de graduación creciente, se realizó una inmersión en xileno y se colocaron los cubreobjetos.

3.5 Cuantificación

La cuantificación de las secciones se llevó a cabo en ciego, de manera que se asignó un código a cada uno de los portaobjetos que no fue revelado hasta el momento en que se analizaron los resultados. Se cuantificaron las células marcadas positivamente (Ki67+) mediante el conteo de 3 portas con 8 secciones del hipocampo en cada una para cada sujeto (24 secciones en total a intervalos de 240 μm) a lo largo del grosor del hipocampo (-1.64 a -5.96 mm de Bregma). Para ello se utilizó un microscopio óptico Leica CM1520 con un objetivo 63X. Debido a las posibles diferencias en tamaño de los cerebros de las ratas utilizadas en función de sus edades, así como para corregir el error causado por las posibles roturas en el tejido, el número de células obtenido se corrigió por el área cuantificada del DG para cada uno de los animales. Para medir el área hipocampal se utilizó un densitómetro calibrado Bio-Rad GS-800 donde se escanearon las secciones y se determinó el área del DG para cada rata utilizando el programa Quantity One. Por tanto, los resultados se muestran como el número de células Ki-67 positivas en el hipocampo corregido por el área cuantificada (células Ki-67+/área mm^2) para cada animal.

3.6 Análisis estadístico

Los resultados que se expresan como los valores medios \pm SEM (error estándar de la media) se analizaron con los programas Microsoft Excel de Microsoft Corporation, (Redmond, Washington, USA) y GraphPad Prism 6.0 de GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA, USA). Las evaluaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA de una o dos vías seguido del test de comparación múltiple (Bonferroni) o del test de Fisher LSD, o mediante la prueba *t* de student cuando se comparan dos grupos experimentales. Las diferencias entre los distintos grupos se consideran como significativas con un nivel de probabilidad (*P*) inferior a 0,05 ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análisis de la proliferación celular basal

Como se ha explicado anteriormente, la primera parte del estudio consistió en el análisis de las diferencias basales en la proliferación celular del DG del hipocampo entre distintas etapas de la adolescencia y la edad adulta mediante la cuantificación de células Ki-67+.

El análisis mediante ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en los niveles de proliferación celular basal ($F_{3, 17} = 3,217$, $P = 0,049$) entre los tres grupos adolescentes y el grupo adulto (Figura 5). El test de Bonferroni reveló un incremento ($72 \pm 12\%$) en los niveles de proliferación basal en la adolescencia media (PND 47) con respecto al grupo adulto (PND 60). Por otra parte, tanto durante la adolescencia temprana (PND 40) como durante la adolescencia tardía (PND 54) se observó un aumento en la proliferación celular ($31 \pm 4\%$ y $31 \pm 5\%$ respectivamente) en comparación con el grupo adulto, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Figura 5).

Para averiguar si los cambios observados en los niveles de proliferación celular en la adolescencia media (PND 47, Figura 5) ocurrían a lo largo de todo el grosor del hipocampo o eran específicos de una localización anatómica determinada (hipocampo anterior vs. posterior), se realizó una cuantificación a lo largo del grosor del hipocampo (desde -1.80 a 4.82 mm del Bregma). Los resultados del análisis mediante un ANOVA de dos vías muestran un efecto a lo largo de la profundidad del hipocampo (mm desde Bregma) ($F_{13, 112} = 4,056$, $P < 0,0001$), así como un efecto de la edad ($F_{1, 112} = 49,87$, $P < 0,0001$) y una interacción entre estos ($F_{13, 112} = 2,286$, $P = 0,01$). Las diferencias a cada punto de Bregma fueron analizadas mediante un test de Fisher LSD, observándose que las

diferencias en la proliferación celular ocurren tanto en la parte anterior como posterior del hipocampo (Figura 6).

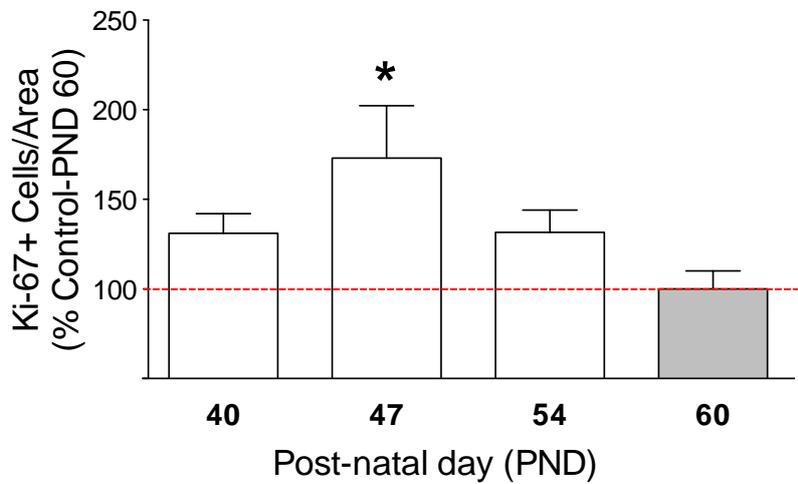


Figura 5: Análisis cuantitativo del número de células Ki-67+ por área (mm²) en el giro dentado del hipocampo en función de la edad. Las columnas representan la media ± SEM de la proliferación celular basal para cada edad (PND 40, 47, 54) en comparación con el grupo control PND 60 (100%). *P < 0,05 PND: post natal day.

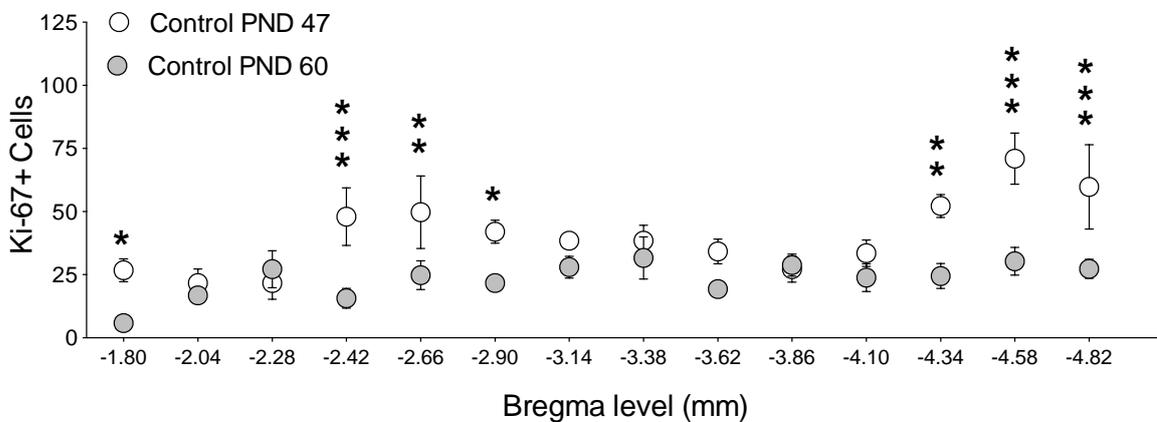


Figura 6: Análisis cuantitativo de células Ki-67+ en relación con la distancia de Bregma del DG del hipocampo. Estudio comparativo de la proliferación celular en el DG del hipocampo entre ratas en adolescencia media y edad adulta a lo largo de la profundidad del hipocampo. Comparación del grupo control adolescente medio (PND 47) y control adulto (PND 60). Los puntos representan la media ± SEM del número de células Ki-67+ de cada grupo en cada punto de Bregma.

4.2 Análisis del efecto de la administración crónica de cocaína

Dadas las diferencias significativas en proliferación basal encontradas durante los estadios de la adolescencia (Figura 5), el efecto de la administración crónica de cocaína sobre la proliferación celular se realizó a cada edad adolescente en concreto. Por tanto a cada edad tenemos dos grupos

experimentales (control vs. cocaína) y por lo tanto se realizó un t-test. Los resultados muestran que la administración crónica de cocaína provocó un aumento en la proliferación del $34\pm 15\%$ durante la adolescencia temprana (PND40) en comparación con su grupo control ($t=2,298$, $p=0,05$) (Figura 7). En cambio, se observó una disminución significativa del $44\pm 20\%$ en la proliferación celular durante la adolescencia media (PND47) en comparación con su grupo control ($t=2,254$, $p=0,03$). La administración de cocaína durante la adolescencia tardía (PND54) no indujo ningún efecto significativo sobre la proliferación celular (Figura 7).

Para averiguar si los cambios observados en los niveles de proliferación celular en la adolescencia temprana (PND 40) y media (PND 47) tras administración crónica de cocaína ocurrían a lo largo de todo el grosor del hipocampo o eran específicos de una localización anatómica determinada (hipocampo anterior vs. posterior), se realizó una cuantificación a lo largo del grosor del hipocampo (desde -1.80 a 4.82 mm del Bregma). Para ello, se llevó a cabo el análisis mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Fisher LSD del número de células Ki-67 cuantificadas a lo largo del hipocampo en los grupos PND 40 y PND 47. Esta representación no mostró diferencias significativas a lo largo del grosor del hipocampo por lo que las diferencias señaladas en las gráficas anteriores no se debían a diferencias en ciertas profundidades del hipocampo sino a la suma de todos los puntos (Figura 8).

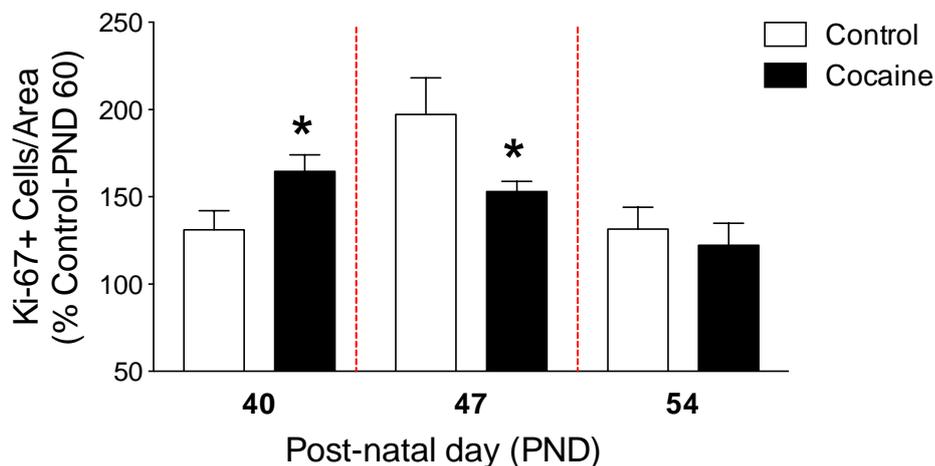


Figura 7: Análisis cuantitativo del número de células Ki-67+ por área (mm^2) cuantificada en el giro dentado del hipocampo para la determinación del efecto de la administración crónica de cocaína en la proliferación celular basal a distintas etapas de la adolescencia. Las columnas representan la media \pm SEM de cada grupo comparado cada uno de ellos con su control. * $P < 0,05$ PND: post natal day.

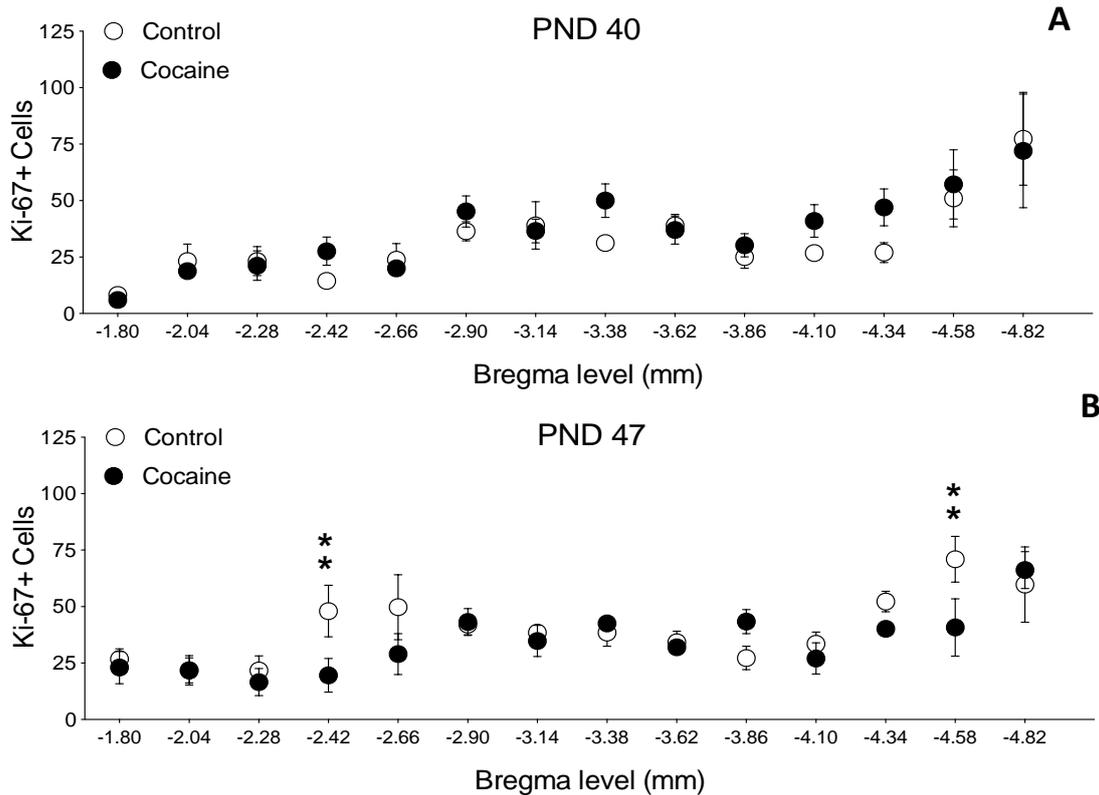


Figura 8 : Análisis cuantitativo de células Ki-67+ en relación con la distancia de Bregma del DG del hipocampo. Estudio comparativo de la proliferación celular en el DG del hipocampo entre ratas tratadas con cocaína y ratas control de distintas edades a lo largo de la profundidad del hipocampo. (A) Comparación del grupo adolescente temprano control y tratado (B) Comparación del grupo adolescente medio control y tratado. Los puntos representan la media \pm SEM del nº de células Ki-67+ de cada grupo en cada punto de Bregma.

5 DISCUSIÓN

La neurogénesis es un proceso de plasticidad neuronal, que implica distintas etapas desde la proliferación celular hasta la maduración neuronal, mediante el que a partir de células precursoras se generan neuronas maduras (Abrous et al., 2005). Este proceso se produce a lo largo de toda la vida (Altman and Das, 1966), sin embargo se ha visto que este proceso no se da en igual medida en todas las edades, viéndose diferencias significativas a lo largo de la adolescencia y de la edad adulta (Kuhn et al., 1996).

En base a esto, el primer objetivo de este trabajo ha sido evaluar las diferencias en la etapa inicial de la neurogénesis (proliferación celular) basal entre distintos estadios de adolescencia (temprana, media y tardía) y la edad adulta utilizando la rata como modelo. La hipótesis inicial, basándose en la etapa de desarrollo y remodelación neuronal que implica el proceso de adolescencia, ha sido que la proliferación celular en el DG, a pesar de mantenerse durante toda la

edad adulta (Altman and Das, 1966, Abrous et al., 2005), sufre una disminución progresiva desde la adolescencia hasta la edad adulta.

Los resultados obtenidos (Figura 5) revelan un incremento de la proliferación celular en todas las etapas de la adolescencia respecto a la edad adulta, sin embargo este incremento solo fue significativo en el caso de la adolescencia media (PND 47). Así, en la adolescencia media se observó un incremento del $72\pm 12\%$ en la proliferación celular respecto a la edad adulta, siendo éste el pico máximo de proliferación generándose así una tendencia asintótica en la proliferación celular desde la adolescencia temprana hasta la edad adulta. Los estudios de Altman y Das (1965; 1966) demostraron mediante la utilización de timidina tritiada que la neurogénesis postnatal alcanza sus niveles máximos de proliferación celular durante la adolescencia media, lo que genera a partir de ese momento una asíntota característica disminuyendo los niveles de proliferación con el aumento de la edad (Altman and Das, 1965, 1966), como se puede observar en nuestros resultados (Figura 5). Diversos estudios han corroborado que la neurogénesis sufre una importante disminución asociada a la edad desde la adolescencia hasta la edad adulta, mostrando valores similares a los del presente estudio. Por ejemplo, en el 2005 se realizó un estudio de la proliferación celular a partir de la administración de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, un nucleótido sintético análogo de la timidina capaz de incorporarse al DNA durante la división celular) en ratas adolescentes (PND 38) y adultas (12 meses) observándose un 92% menos de proliferación celular en las ratas adultas que en adolescentes (McDonald and Wojtowicz, 2005), lo que indica que la proliferación celular sigue decreciendo a lo largo de la edad adulta, en relación con los niveles tan disminuidos a los 12 meses. Posteriormente, mediante un diseño experimental similar llevado a cabo con BrdU se pudo observar de nuevo una disminución drástica de la proliferación celular entre grupos adolescentes (PND 30) y adultos (PND 120) (He and Crews, 2007).

En cuanto al análisis de las diferencias en la proliferación celular durante la adolescencia media (PND 47) y la edad adulta (PND 60) a lo largo del grosor del hipocampo (Figura 6) los resultados revelaron que las diferencias proliferativas se encuentran en toda la extensión del hipocampo.

Las funciones de la neurogénesis no están completamente definidas, pero se atribuyen funciones al hipocampo de consolidación de la memoria y el aprendizaje, por lo que se relaciona la neurogénesis con estos procesos. Por este motivo, el hecho de que la proliferación celular sea más elevada durante la adolescencia se ha asociado con la mayor capacidad de aprendizaje de los adolescentes frente a los adultos y la pérdida de habilidad cognitiva con el aumento de la edad (McDonald and Wojtowicz, 2005, He and Crews, 2007), así como con la elevada plasticidad neuronal asociada a esta etapa de la vida (He and Crews, 2007). A partir de estos datos sería interesante

realizar estudios para intentar determinar las funciones específicas de la neurogénesis y así comprender mejor el papel de este proceso en la plasticidad neuronal adolescente así como los distintos efectos asociados a una disminución del mismo.

El estudio del papel de la neurogénesis en el hipocampo es de vital importancia en el análisis de la implicación de este proceso en la adicción y la recaída. Existen numerosas evidencias que asocian alteraciones en el hipocampo con el desarrollo de procesos adictivos y recaídas tras largos períodos de abstinencia (Deschaux et al., 2014) y se ha asociado la alteración de la plasticidad hipocámpal y la neurogénesis con el comportamiento de búsqueda y abuso de drogas (Noonan et al., 2010). En el desarrollo de pautas adictivas, se cree que cuanto antes se inicia el consumo de drogas mayor es la probabilidad de desarrollar una adicción (Spear, 2000).

Basándose en las anteriores evidencias el presente estudio ha tenido como segundo objetivo analizar los efectos de la administración crónica de cocaína en la proliferación celular en el DG del hipocampo de tres grupos de ratas adolescentes. La administración crónica de cocaína causó distintos efectos en cada uno de los grupos de adolescencia (temprana, tardía y media) respecto a sus controles (Figura 7), de modo que provocó un incremento del $34\pm 15\%$ en la proliferación celular durante la adolescencia temprana (PND 40) mientras que durante la adolescencia media (PND 47) indujo una disminución del $44\pm 20\%$ de la proliferación. Por último la administración de cocaína no provocó ningún efecto significativo en la proliferación celular en la etapa de adolescencia tardía (PND 54). A pesar de que no se han realizado estudios previos que analicen los efectos de la administración crónica de cocaína en estadios tan tempranos de la adolescencia, estudios similares con alcohol evidencian una disminución en la proliferación celular en el DG tanto en ratas mediante el análisis de células BrdU+ (Crews et al., 2006) como en experimentos con primates a través de la cuantificación de células Ki-67+ (Taffe et al., 2010). Asimismo Loyd. et al. (2010), en un estudio en ratones adultos mediante inmunoanálisis de células BrdU+ observaron un incremento de la proliferación celular a los 3 días de abstinencia tras un tratamiento crónico con cocaína (Lloyd et al., 2010). Sin embargo, una gran diversidad de estudios contradicen dichos resultados, siendo la teoría más generalizada que las drogas de abuso, y en concreto la cocaína, producen un efecto negativo sobre la proliferación celular y formación de nuevas neuronas en el DG del hipocampo (Mandyam and Koob, 2012). Existen numerosos estudios que avalan esta teoría mostrando que la cocaína induce una disminución significativa de la proliferación celular tanto durante el abuso crónico de cocaína (Yamaguchi et al., 2004, Deschaux et al., 2014) como durante el proceso de abstinencia (García-Fuster et al., 2011) en el hipocampo de rata adulta. Los resultados de este estudio observados durante la adolescencia media van en el mismo sentido neurotóxico detallado en la literatura, donde la cocaína crónica disminuye la proliferación celular. Sin embargo, las diferencias entre los efectos del tratamiento entre la

adolescencia temprana (incremento de la proliferación celular) y media, probablemente se deben a las diferencias en los índices de proliferación entre ambas edades, ya que durante la adolescencia temprana la proliferación todavía se encuentra en aumento mientras que durante la adolescencia media se ha alcanzado un nivel máximo. Estas diferencias en la tasa de plasticidad neuronal podrían provocar un efecto diferencial del tratamiento. No obstante, con el objetivo de entender mejor las diferencias observadas entre ambos grupos de adolescencia tras el tratamiento con cocaína se están analizando los índices de supervivencia celular mediante el marcador exógeno BrdU como otro marcador neurogénico. Una posible disminución del número de células BrdU+ sugeriría una inducción neurotóxica de la cocaína al estar inhibiendo otro estadio de la neurogénesis hipocampal.

En cuanto al análisis de las diferencias entre los grupos a lo largo del grosor del hipocampo (Figura 8) no se vieron diferencias significativas en ningún punto por lo que las diferencias comentadas anteriormente se deben a la suma de las diferencias entre los puntos, lo que implica que la cocaína afecta de igual modo a todas las regiones neurogénicas del hipocampo.

El hipocampo se asocia con funciones como la formación de la memoria espacial y el aprendizaje, lo que relaciona posibles alteraciones en su estructura y plasticidad, como alteraciones en la neurogénesis, con el posible desarrollo de memorias asociadas a las conductas adictivas que permanecen a lo largo del tiempo, y permitiría explicar los procesos de recaída (Lloyd et al., 2010). Por este motivo se está estudiando el hecho de que el reforzamiento de la neurogénesis durante la abstinencia pueda utilizarse como tratamiento para los procesos adictivos impidiendo así el elevado número de recaídas (Mandyam and Koob, 2012). Esta implicación de la alteración de neurogénesis ante la vulnerabilidad de desarrollar una adicción ha sido estudiada a través de la inhibición de dicho proceso en el cerebro de ratas adultas mediante radiación para, a continuación, observar si se mostraba una conducta más propensa a la adicción (Noonan et al., 2010). Los resultados de dicho estudio revelaron que las ratas a las que se había irradiado y tenían por tanto niveles menores de neurogénesis, presentaban un comportamiento mayor de autoadministración de cocaína (Noonan et al., 2010). Coincidiendo con el estudio anterior, Deschaux et al. (2014) demostraron que la interrupción del proceso neurogénico tras la exposición crónica a cocaína en ratas adultas aumenta la tasa de recaídas (Deschaux et al., 2014). De modo que el estudio de terapias que intensifiquen el proceso neurogénico, como es el caso del deporte o los antidepresivos, puede ser prometedor para el tratamiento de estos trastornos adictivos siendo muy necesario llevar a cabo más estudios para poder entender mejor los procesos moleculares involucrados en el mantenimiento de este proceso.

6 CONCLUSIONES

El periodo de adolescencia se asocia a un elevado índice de proliferación celular en el DG del hipocampo, alcanzando sus niveles máximos durante la adolescencia media (PND 47) y disminuyendo progresivamente desde este momento.

La cocaína induce la inhibición de los procesos proliferativos en el DG del hipocampo tras su administración crónica durante la adolescencia, lo que puede estar íntimamente relacionado con la alta susceptibilidad de esta etapa de la vida a desarrollar adicciones.

El desarrollo de tratamientos que impliquen el reforzamiento de la neurogénesis podría ser una terapia prometedora para llevar a cabo el tratamiento de los procesos adictivos y prevenir las recaídas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85:523-569.
- Alcaraz VcM (2001) Estructura y función del sistema nervioso : recepción sensorial y estados del organismo. México, D.F: Editorial El Manual Moderno.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J, Das GD (1966) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126:337-389.
- Andersen P (2007) *The hippocampus book*. New York ; Oxford: Oxford University Press.
- Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R (2007) Neurogénesis en el cerebro adulto. pp 541-550 *Revista de neurología: Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México.*
- Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppe E (2010) Dopaminergic reward system: a short integrative review *International Archives of Medicine: Biomed central.*
- Caballero Martínez L (2005) ADICCIÓN A COCAÍNA: NEUROBIOLOGÍA CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO pnsd Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Callado LF (2001) Neurobiology of drug abuse II. Cocaine and "designer drugs". vol. 4, pp 197-210: Universidad del País Vasco.
- Crews F, He J, Hodge C (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86:189-199.
- Crews FT, Mdzinarishvili A, Kim D, He J, Nixon K (2006) Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience* 137:437-445.
- Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN (2003) Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry* 160:1041-1052.

- Deschaux O, Vendruscolo LF, Schlosburg JE, Diaz-Aguilar L, Yuan CJ, Sobieraj JC, George O, Koob GF, Mandyam CD (2014) Hippocampal neurogenesis protects against cocaine-primed relapse. *Addict Biol* 19:562-574.
- Dvorkin, Cardinali, Iermoli (2010) *Best & Taylor Bases fisiológicas de la práctica médica*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- EMCDDA (2013) Cocaine an crack. vol. 2014 <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/cocaine>: European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA).
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- García-Fuster MJ, Fligel SB, Mahmood ST, Mayo LM, Thompson RC, Watson SJ, Akil H (2011) Decreased proliferation of adult hippocampal stem cells during cocaine withdrawal: possible role of the cell fate regulator FADD. *Neuropsychopharmacology* 36:2303-2317.
- George O, Mandyam CD, Wee S, Koob GF (2008) Extended access to cocaine self-administration produces long-lasting prefrontal cortex-dependent working memory impairments. *Neuropsychopharmacology* 33:2474-2482.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159:1642-1652.
- He J, Crews FT (2007) Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol Biochem Behav* 86:327-333.
- Henningfield JE, London ED, Pö S (2009) *Nicotine psychopharmacology*. Berlin: Springer.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97-105.
- Kelley AE, Schochet T, Landry CF (2004) Risk taking and novelty seeking in adolescence: introduction to part I. *Ann N Y Acad Sci* 1021:27-32.
- Koob GF, Caine B, Markou A, Pulvirenti L, Weiss F (1994) Role for the mesocortical dopamine system in the motivating effects of cocaine. *NIDA Res Monogr* 145:1-18.
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217-238.
- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5768-5773.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Lloyd SA, Balest ZR, Corotto FS, Smeyne RJ (2010) Cocaine selectively increases proliferation in the adult murine hippocampus. *Neurosci Lett* 485:112-116.
- Mandyam CD, Koob GF (2012) The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci* 35:250-260.
- McDonald HY, Wojtowicz JM (2005) Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385:70-75.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nestler EJ (2005) The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 3:4-10.
- Nieuwenhuys, Voogd, Huijzen v (2009) *El sistema nervioso central humano*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Noonan MA, Bulin SE, Fuller DC, Eisch AJ (2010) Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *J Neurosci* 30:304-315.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Elsevier Inc.
- Puelles L (2008) *Neuroanatomía*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Redolar Ripoll D (2008) *Cerebro y adicción*: UOC (UNIVERSITAT OBERTA DE CATALUNYA).
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219-1223.

- Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 78:625-636.
- Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39:257-266.
- Romer D (2010) Adolescent risk taking, impulsivity, and brain development: implications for prevention. *Dev Psychobiol* 52:263-276.
- Schmidt HD, Duman RS (2007) The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol* 18:391-418.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417-463.
- Spear LP (2007) Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol Teratol* 29:1-9.
- Spear LP (2011) Rewards, aversions and affect in adolescence: emerging convergences across laboratory animal and human data. *Dev Cogn Neurosci* 1:392-400.
- Sudai E, Croitoru O, Shaldubina A, Abraham L, Gispan I, Flaumenhaft Y, Roth-Deri I, Kinor N, Aharoni S, Ben-Tzion M, Yadid G (2011) High cocaine dosage decreases neurogenesis in the hippocampus and impairs working memory. *Addict Biol* 16:251-260.
- Taffe MA, Kotzebue RW, Crean RD, Crawford EF, Edwards S, Mandyam CD (2010) Long-lasting reduction in hippocampal neurogenesis by alcohol consumption in adolescent nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11104-11109.
- von Bohlen uHO (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345:1-19.
- Yamaguchi M, Suzuki T, Seki T, Namba T, Juan R, Arai H, Hori T, Asada T (2004) Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 1025:351-362.