



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Final de Grado

Efectos de la administración de d- anfetamina en los índices de proliferación celular en el hipocampo de rata adolescente y adulta

Cristian Bis Humbert

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 43206668H

Trabajo tutelado por M. Julia García Fuster

Departamento de Biología



Se autoriza la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo:

D-anfetamina, neurotoxicidad, proliferación celular, edad.

Índice

ÍNDICE	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
ADICCIÓN A DROGAS	5
ANFETAMINAS	5
NEUROTOXICIDAD	7
NEUROGÉNESIS	7
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10
ANIMALES	10
TRATAMIENTO	11
EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS	11
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	11
INMUNOHISTOQUÍMICA	12
CONTAJE DE LAS MUESTRAS	13
ANÁLISIS DE LOS DATOS	13
RESULTADOS	13
COMPARACIONES EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR ENTRE RATAS ADOLESCENTES Y ADULTAS	13
EFFECTO DE LA D-ANFETAMINA EN RATAS ADOLESCENTES (PND 37)	15
EFFECTO DE LA D-ANFETAMINA EN RATAS JÓVENES-ADULTAS (PND 58)	16
COMPARACIÓN DEL EFFECTO DE LA D-ANFETAMINA ENTRE RATAS ADOLESCENTES Y JÓVENES-ADULTAS	17
DISCUSIÓN	17
ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN BASAL EN RATA ADOLESCENTE Y JÓVENES-ADULTAS	17
EFFECTO DE LA D-ANFETAMINA EN RATAS ADOLESCENTES Y JÓVENES-ADULTAS	18
CONCLUSIÓN	19
AGRADECIMIENTOS	19
BIBLIOGRAFÍA	20

Resumen

La disminución de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo está relacionada con la adicción a las drogas de abuso, siendo la anfetamina una de las más consumidas entre el período adolescente y adulto. En este estudio se comparó como afecta la administración aguda (1 día) y crónica (4 días) de d-anfetamina (5 mg/Kg, 3 dosis, 1 cada 3h) en ratas macho Sprague Dawley de diferentes edades, adolescentes (PND 37) y jóvenes-adultas (PND 58). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas a nivel basal entre las edades, donde el grupo adolescente mostró una mayor proliferación celular que el grupo joven-adulto. Sin embargo, al comparar los tratamientos entre las diferentes edades no se observaron diferencias significativas como para afirmar que la d-anfetamina afecte a la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo entre los grupos de estudio, aunque cabe destacar que en jóvenes-adultos se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos agudo y crónico, presentando las ratas a las que se les administró el tratamiento crónico una disminución en la proliferación celular, respecto a las ratas del tratamiento agudo.

Abstract

The reduction of cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus is related to drug addiction, being amphetamine one of the most commonly used drugs between adolescence and adulthood. This study compared how acute (1 day) and chronic (4 days) administration of d-amphetamine (5 mg/Kg, 3 doses, 1 each 3h) affects male Sprague Dawley rats, in earlier adolescence (PND 37) or in young-adulthood (PND 58). The results reported significant differences in basal cell proliferation between adolescence and adulthood, with adolescence showing a higher cell proliferation than young-adults. Notwithstanding, acute and chronic administration of d-amphetamine did not alter cell proliferation in adolescent or young-adult rats. However, it must be underlined that significant differences were spotted in both acute and chronic administration in young-adult rats, where a major cell proliferation in acute administration was detected in comparison with rats that were administered with d-amphetamine chronically.

Introducción

Adicción a drogas

La adicción es la pérdida de control sobre el consumo de drogas y su búsqueda. Se requieren exposiciones repetidas a la droga de abuso para que esta cause adicción y acentúe la vulnerabilidad del sujeto a una futura recaída, lo que implica que se produzcan una serie de cambios en el cerebro relacionados con la adicción.

Proyecciones a la región mesolímbica del cerebro y el córtex prefrontal, forman parte de los circuitos críticos para modular el riesgo, la búsqueda y el comportamiento social (Le Moal et al., 1991), y para la fijación de relevancia motivacional para las recompensas naturales (como los estímulos sociales, novedosos o relacionados con la comida), así como el alcohol y otras drogas de abuso (Berridge y Robinson, 2003). El estriado ventral es una región del cerebro que incluye el núcleo accumbens (NAc) y algunos núcleos del tubérculo olfatorio, cuya proyección terminal de las conexiones neuronales del área tegmental ventral (VTA) y el córtex prefrontal, se considera como un punto de coordinación para la recompensa y el restablecimiento asociado con el comportamiento de búsqueda de drogas (Koob y Volkow, 2010). La liberación de dopamina en estas regiones, se considera que está modulada por el consumo de drogas de abuso (Luo et al., 2011). Neurotransmisores diferentes a la dopamina, podrían desempeñar un papel importante en los efectos de recompensa.

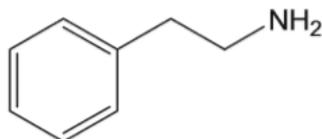
La edad debe considerarse un factor importante a tener en cuenta en la adicción, ya que durante la adolescencia se producen una serie de alteraciones neuronales, como el sacrificio de las conexiones sinápticas, llegándose a perder cerca del 50% de estas en zonas del córtex prefrontal y otras regiones neocorticales (Rakic et al., 1994). Hay un declive de la utilización de energía asociada al cerebro en la adolescencia, tanto en humanos como en otras especies, alcanzándose en la infancia elevadas tasas de flujo sanguíneo, conjuntamente con una alta utilización de oxígeno y glucosa, que gradualmente van a ir bajando durante la adolescencia, alcanzando menores tasas de consumo energético, tal como puede encontrarse en cerebros adultos. Las variaciones ontogénicas en los patrones de producción y utilización de la dopamina, muestran una síntesis mayor en el córtex prefrontal durante la adolescencia temprana que en la tardía y en la etapa adulta. Por otro lado, en el NAc y estriado sus niveles de síntesis son menores antes de finalizar el periodo adolescente (Teicher et al., 1993. Andersen et al., 1997). La plasticidad neuronal en el hipocampo subyace en función de los sistemas de aprendizaje y memoria, también contribuye a la maduración de las vías de recompensa en la adicción (Hyman et al., 2006), el abuso de estas sustancias compromete estos sistemas, contribuyendo a la impulsividad y al deterioro de la toma de decisiones (Koob y Le Moal, 1997).

Anfetaminas

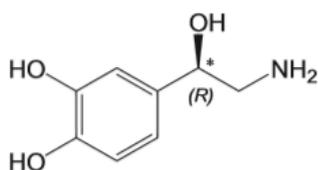
Las amfetaminas son sustancias psicoactivas pertenecientes a la familia de la feniletilamina, que incluye un amplio rango de sustancias que pueden producir efectos estimulantes, euforizantes, anoréxicos, entactogénicos o alucinógenos (Carvalho et al., 2012). Las amfetaminas tienen un anillo fenilo, una cadena lateral de dos carbonos entre el anillo fenilo y el nitrógeno, un grupo

α -metilo y un grupo amino primario. La anfetamina posee dos formas ópticas activas, la forma levógira llamándose l-anfetamina y la forma dextrógira pasándose a llamar d-anfetamina o dextro-anfetamina (Bett, 1946), esta última ha sido la elegida para realizar este estudio siendo el isómero más potente de los dos descritos (figura 1).

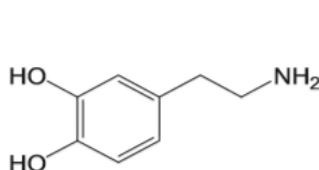
2-D structures:



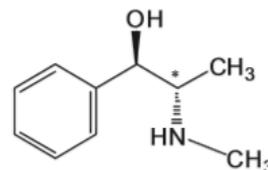
2-phenethylamine (β -phenylethylamine)



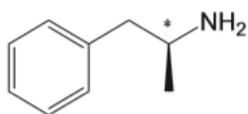
Noradrenaline



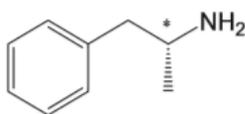
Dopamine



Ephedrine



d-Amphetamine



l-Amphetamine

Figura 1. Representación gráfica en 2-D y 3-D de varias estructuras biológicas derivadas de las β -feniletilaminas (imagen modificada sacada de Heal et al., 2013).

Son fármacos cuyos efectos se hacen notables a los 30 min después de su administración. Su distribución en el organismo es completa, de manera que atraviesa muy bien la barrera hematoencefálica, produciendo su acumulación cerebral. La d-anfetamina sufre una metabolización de entre el 50 y el 70% de la dosis administrada, eliminándose gran parte de esta por la orina (Flórez, 1997). Se conoce que interactúan con el transportador de monoaminas en el sistema nervioso central, actuando como sustratos para los transportadores de membrana de la norepinefrina, dopamina y serotonina debido a que sus estructuras son similares con los neurotransmisores de monoaminas (Rothman et al., 2001; Rothman y Baumann, 2003). Estas bases ayudaron a establecer la d-anfetamina como un fármaco conocido por su capacidad de inhibir débilmente la recaptación de dopamina, moderadamente potente la recaptación de noradrenalina y débilmente la recaptación de serotonina (Easton et al., 2007). Se conoce que la administración de psicoestimulantes como las anfetaminas, estimula la liberación de dopamina de los terminales mesolímbico y estriatal (Fischer y Cho, 1979); de manera que se cree que esta estimulación daría lugar a cambios neuroadaptativos relacionados con la adicción (Nestler y Aghajanian, 1997; White y Kalivas, 1998; Wang y McGinty, 1999).

Neurotoxicidad

Los efectos neurotóxicos de las drogas de abuso han sido estudiados extensamente, y en particular los de la d-anfetamina, demostrándose claramente sus habilidades para dañar las células monoaminérgicas cerebrales, provocando deficiencias a largo plazo en los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos en diferentes áreas cerebrales de los animales de experimentación (Villemagne et al., 1998). Se ha comprobado que en animales de laboratorio sus efectos agotan los niveles cerebrales de monoaminas. Se demostró que inyectando a ratas 17 mg/Kg dos veces al día d-anfetamina, los niveles cerebrales de norepinefrina aumentaban (McLean y McCartney, 1961), persistiendo los efectos varios días después de la administración de la última inyección. En estudios en los que ha administrado d-anfetamina a ratas previamente tratadas con iprinidol, que interfiere en el metabolismo del fármaco y prolonga su vida media, se observa una pérdida de terminales nerviosos para la dopamina dos semanas después del tratamiento (Seiden y Ricaurte, 1987). Además de los daños causados en los sistemas neuronales dopaminérgico y serotoninérgico, las anfetaminas también pueden inducir la muerte neuronal. La exposición a las anfetaminas durante la adolescencia conduce a alteraciones neurofisiológicas de larga duración, reflejado en el comportamiento de los animales de experimentación. Los adolescentes son menos sensibles a los efectos psicocomotores de las anfetaminas, pero más vulnerables al deterioro cognitivo que en adultos. Por otra parte, los efectos anfetamínicos en las funciones cognitivas parecen ser dependiente de la edad de exposición. Diversos estudios con drogas de abuso han mostrado que pueden afectar en gran medida a las capacidades cognitivas del sujeto, lo que puede reflejarse durante su vida (King et al., 2010), prevaleciendo su uso en mayor medida en los adolescentes y jóvenes-adultos (EMCDDA, 2013). La exposición a las anfetaminas durante la adolescencia promueve una sensibilización comportamental a una reexposición a las anfetaminas en la edad adulta (Teixeira et al., 2014).

Aunque a lo largo de los años se ha experimentado extensamente con este fármaco, todavía se plantean preguntas respecto a posibles efectos neurotóxicos como una posible interacción en la neurogénesis hipocampal (por ejemplo la proliferación celular) que podrían darse al administrarse tratamientos agudos y crónicos en diferentes periodos de tiempo, pregunta que pretende responderse en este estudio.

Neurogénesis

La neurogénesis consiste en un proceso a través del cual se forman neuronas funcionales utilizando como precursor células progenitoras. En mamíferos, se han descrito dos zonas en las que se produce la neurogénesis que son los bulbos olfatorios y el hipocampo, estimándose que en ratas jóvenes-adultas el número de neuronas nacientes que se generan a partir de las células precursoras al día es de 103 (Amrein et al., 2011; Lledo et al., 2006). Se generan y desarrollan neuronas individuales, de manera que se repueblan y revisan las redes neuronales, actuando como una forma de neuroplasticidad. Forman parte del proceso la proliferación neuronal, la determinación celular, la diferenciación y migración celular y la supervivencia celular (Ming y Song, 2005). Es un proceso que no permanece estático, gracias a la variabilidad que experimenta su tasa (Peterson et al., 2002), siendo la influencia del ambiente tal que cambiando ciertas condiciones ya sea en la actividad física, la alimentación o incluso condiciones estresantes puede

verse afectado (Tanapat et al., 2001; 2005). El proceso actúa de manera que la plasticidad sináptica se ve aumentada, siendo esta un mecanismo de aprendizaje y memoria (Chambers et al., 2004; Luu et al., 2012). En este estudio nos centraremos en la proliferación celular de la región hipocampal del giro dentado (DG), que se encuentra formado por unos densos empaquetamientos de somas de pequeño tamaño, que es donde se encuentran las células granulares. En su capa más profunda se encuentran una gran variedad de tipos celulares (Amaral y Witter et al., 1989), y una capa que se compone de células precursoras con capacidad de proliferar (Altman y Bayer, 1990; Seri et al., 2001). En el DG la neurogénesis se inicia con la proliferación de precursores neuronales de la capa subgranular, a continuación tiene lugar la diferenciación celular, que ocurre conjuntamente con la migración de estas células hasta la capa granular (Ming y Song, 2005). Las células migratorias irán desarrollando proyecciones que se extenderán hacia las regiones donde se situarán en la capa granular, una vez posicionadas emiten proyecciones axonales a las fibras musgosas donde interaccionarán con las células piramidales de la región CA3, integrándose así en la red de circuitos del hipocampo (Laplagne et al., 2006), (figura 2).

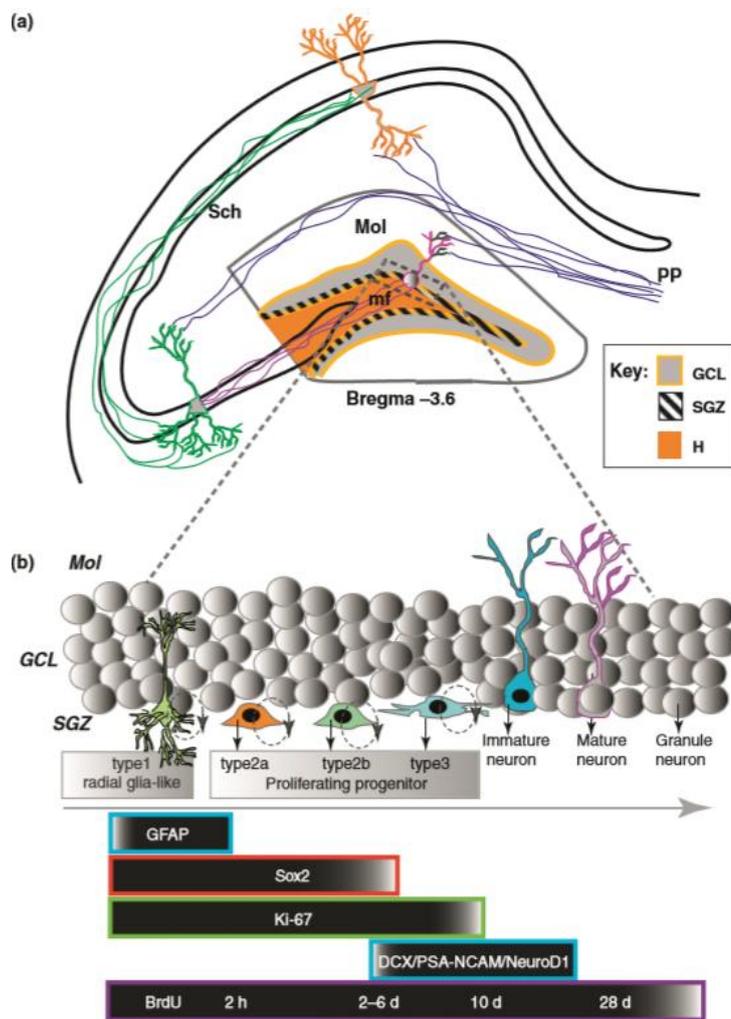


Figura 2. Esquema de la sección coronal a través del hipocampo cerebral de ratona y distintos tipos celulares. (a) DG del hipocampo a una distancia de -3.6 mm del bregma (DG; naranja, negro y gris). Se indican las vías trisinápticas del hipocampo: vía prefrontal (PP) con las conexiones en color lila, fibras musgosas (mf) con sus conexiones en color

rosa y las colaterales de Schaffer (Sch) con sus conexiones en verde. El DG se dividen en capa molecular (Mol), la capa de células granulares (GCL, en gris), y el hilio (H, en amarillo). La zona subgranular (SGZ) se representa con un área con rallas negras entre la capa de células granulares y el hilio. (b) Representación aumentada de las neuronas de la capa granular (GCL). El esquema del hipocampo muestra una secuencia preneuronal, neuronal temprana y los tipos de células postmitóticas durante la neurogénesis postnatal. Las células nacen como células radiales de la glía, como células madre (type 1) y van dividiéndose poco a poco para producir células de tipo 2 (type 2). Estas se van dividiendo rápidamente hasta diferenciarse en células en células inmaduras (type 3), dando neuronas inmaduras, que se convertirán en neuronas maduras y finalmente en células granulares maduras. También se representan varios marcadores de proliferación endógenos como el Y-box (Sox 2) y el Ki-67 utilizado en este estudio, y de diferenciación que pueden ser utilizados combinadamente para determinar el tipo celular de las células proliferantes. (Imagen de Mandyam y Koob, 2012).

La diferenciación es una etapa que está muy ligada al momento en el que las células salen del ciclo, ya que las que lo hacen tempranamente poseerán características diferentes de las que lo hacen de más tardíamente (Ohnuma y Harris, 2003). Para poder observar estas etapas de la neurogénesis se utilizan una serie de marcadores que permiten ver los diferentes estadios celulares, tal como se ha mostrado (figura 2). Para este estudio se utilizó el marcador Ki-67. Su nombre hace referencia al clon original del anticuerpo identificado en proteínas asociadas al ciclo celular (mKi67), esta proteína se encuentra codificada en el cromosoma 7 de los ratones, y aparece durante la progresión del ciclo celular (Endl et al., 2001). Mientras tiene lugar la interfase, el antígeno del Ki-67 puede detectarse de manera exclusiva en el núcleo de la célula, que se encuentra presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero está ausente en las de reposo (G0) (Scholzen y Gerdes, 2000), por otro lado en mitosis la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas, de manera que permite visualizar las células que se están dividiendo en el momento.

Existen diferencias neurogénicas en las diferentes etapas de vida, encontrándose en la etapa adolescente diferencias respecto a la adulta en cuanto a la proliferación celular en el DG del hipocampo. De esta manera los rangos de edad en las etapas del desarrollo de los animales de laboratorio pueden dividirse de la siguiente manera: un periodo neonatal, cuyas fechas después del nacimiento (PND) son del día 1 al 27; un periodo adolescencia temprana, con un PND que va del día 28 al 37; le sigue el periodo de media adolescencia, cuyo PND va del día 38 al 51; a continuación tendría lugar la etapa de adolescencia tardía (joven-adulto), con un PND que va del día 52 al 60; y finalmente la etapa adulta tiene su PND empieza al día 60 (Cox et al., 2014).

Los efectos que producen las drogas de abuso en la neurogénesis es un tema muy estudiado. Se han encontrado diferentes tipos de alteraciones en el proceso, en cual influye la edad, el ambiente y los cambios neuroquímicos. Los efectos de las drogas de abuso están relacionadas con la inhibición del proceso de neurogénico en el hipocampo y se explicarán a continuación. La capacidad del cerebro en la generación celular, sobretodo en la edad adulta, puede tener un papel importante en la adicción, que se considera un trastorno que asocia al consumo de drogas. Se ha sugerido que las alteraciones en el proceso de neurogénesis en regiones del hipocampo cerebral y del córtex pueden, desempeñar un papel importante en la vulnerabilidad a la recaída. El proceso proliferativo implicado en el aprendizaje y la memoria, está relacionado con la adicción, concretamente con el establecimiento y la utilización de la representación espacial. De

manera que a bajas tasas neurogénicas el sujeto es más vulnerable a la adicción y su aumento es considerado una estrategia terapéutica frente a la adicción (Chambers, 2013), por lo que una vez se ha normalizado el proceso neurogenético, se reduciría la vulnerabilidad a la recaída, ayudando a la recuperación.

Objetivos

Los objetivos concretos del trabajo son:

- 1) La revisión de la literatura científica sobre el conocimiento actual de la posible neurotoxicidad hipocampal (disminución de los índices de neurogénesis) inducida por la d-anfetamina.
- 2) El aprendizaje de la metodología necesaria para evaluar marcadores de neurogénesis en el hipocampo de rata mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- 3) La cuantificación de los índices de proliferación celular en el hipocampo de rata adolescente y joven-adulta tras tratamiento farmacológico con d-anfetamina aguda y/o crónica.
- 4) El análisis de los resultados así como su evaluación estadística.

Materiales y métodos

Animales

Para este experimento se utilizaron 36 ratas macho Spargue Dawley, que fueron compradas en Charles River (L'Ambresle, Francia). Se utilizaron ratas adolescentes (PND 33, n=18, 75-100 g), y ratas jóvenes-adultas (PND 54, n=18, 200-225 g). Las ratas se alojaron con acceso libre a comida (dieta estándar y de agua), en un ambiente controlado (22°C, 70% de humedad, y 12 h de luz). Antes de empezar el proceso experimental, durante dos días, se habituó a las ratas a ser manipuladas por el experimentador, realizándoles los mismos movimientos a los que serían sometidas en la fase experimental. Todos los cuidados animales y procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices éticas estándar (U.K. Animals, Scientific Procedures, Act, 1986 and European Communities Council Directive 86/609/EEC) y aprobados por el Comité Local Bioético (UIB-CAIB). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de ratas y su sufrimiento.

Tratamiento

Las 36 ratas se dividieron por la edad, de manera que un grupo estaba compuesto por las adolescentes (PND 37, n=18) y el otro por las jóvenes-adultas (PND 58, n=18). En ambos grupos se destinaron 6 ratas para cada tratamiento. Se realizaron 3 grupos, uno por cada tratamiento del fármaco d-anfetamina (dextroamphetamine, ABCAM Ing.): control, agudo y crónico. En el caso del tratamiento agudo se inyectaron durante 3 días salino (1 mg/Kg) (PND 33-35 o PND 54-56) y el último día (PND 36 o PND 57) se administraron 3 dosis (5 mg/Kg) de fármaco administrando una cada tres horas. Para el tratamiento crónico se inyectaron 3 dosis (5 mg/Kg) administrando una cada tres horas durante los 4 días de tratamiento (PND 33-36 o PND 54-57). En el caso del tratamiento control se les inyectó salino (1 mg/Kg) a las ratas todos los días (PND 33-36 o PND 54-57). Todas las administraciones del fármaco se realizaron intraperitonealmente. Las dosis empleadas en este trabajo siguen como punto de referencia las establecidas según (Vorhess et al., 2005).

Extracción de las muestras

Una vez finalizados los tratamientos durante los periodos anteriormente establecidos, se procedió a sacrificar a los animales mediante decapitación 24h después de la última dosis (PND 37 o PND 58). Posteriormente, se procedió a la extracción del cerebro de los distintos animales y a continuación, se introdujeron en isopentano a una temperatura de entre unos -20/-30°C y finalmente se congelaron a -80°C. En este estudio utilizamos el hemisferio izquierdo del cerebro extraído.

Preparación de las muestras

Para cada muestra cerebral recogida anteriormente se realizaron cortes histológicos de 30 µm y se colocaron uno de cada ocho cortes en los portaobjetos. Al realizar un corte, este se adhería en la esquina inferior derecha del portaobjetos (véase 1, A1), el siguiente corte se situó en la parte superior derecha (véase 9, A1), siendo este el noveno respecto al primero añadido y así sucesivamente, se dispusieron los cortes en zig-zag hasta completar las 8 muestras por portaobjetos. Los cortes se realizaron con la intención de que las muestras fuesen de DG del hipocampo (-1,72 a -6,80 mm del Bregma). Finalmente, obtendremos en total de 24 cortes por cada 3 portaobjetos, tal como se muestra a continuación (figura 3).

Rat #	57	41	25	9	+
A1	49	33	17	1	+
Rat #	121	105	89	73	+
A2	113	97	81	65	+
Rat #	185	169	153	137	+
A3	177	161	145	129	+

Figura 3. Representación gráfica de la disposición de los cortes histológicos en los portaobjetos, representando la parte anterior del hipocampo las secciones A1, la parte media de las secciones A2 i la parte posterior las secciones A3.

Inmunohistoquímica

En este estudio se observó el efecto de la d-anfetamina sobre la proliferación celular en el DG del hipocampo de rata. Se utilizó el marcador endógeno Ki-67 (Scholzen y Gerdes, 2000), para marcar las células de la proliferación de las secciones hipocampales cortadas anteriormente (30 μ m), que posteriormente fueron fijadas en paraformaldehído al 4%. La exposición del antígeno (10% de citrato de sodio a pH 6.0, 90°C durante 1 h) fue seguida de un lavado en PBS y por el bloqueo de las secciones realizadas en una solución que contenía (0,3% H₂O₂ (60 ml stock al 3% + 540 ml PBS) durante 30 min (García-Fuster et al., 2010), para inhibir la actividad peroxidasa. A continuación se realizaron 3 lavados seguidos de las muestras y se marcaron los bordes de los portaobjetos con un rotulador (PAP PEN) que impermeabilizaba la superficie para evitar que las muestras pierdan líquido, cuidadosamente sin dañar ninguna muestra. Seguidamente, se adaptaron las muestras en la cámara de hibridación y se incubaron durante 1 h con 500 μ l de BSA (bovine serum albumin) con suero de cabra al 2%. Finalizado el tiempo de incubación, se descartó el diluyente y las muestras fueron incubadas todas la noche con el anticuerpo policlonal Ki-67 (1:40000), a continuación se administró el anticuerpo secundario (1:1000). La unión del anticuerpo se detectó gracias al complejo Avidina/Biotina (60 μ l de Avidina + 60 μ l de Biotina en 60 ml de BSA) y el Mix del cromógeno DAB (360 mg DAB + 4.5 ml de H₂O₂ al 3% en 900 ml de acetato sódico). Todas las secciones se tiñeron con violeta de cresil, para teñir los núcleos de las células del hipocampo, se deshidrataron mediante una batería de alcoholes de graduaciones ascendientes, se sumergieron en xileno y posteriormente fueron cubiertos con un cubre objetos al que se le añadió una gota de adhesivo.

Contaje de las muestras

Las células marcadas positivamente que tenían un color amarronado se contaron “a ciegas” (sin saber ni el tratamiento, ni si la muestra correspondía a una rata tempranamente joven o una joven-adulta) en el DG del hipocampo (-1.72 a -6.80 mm de Bregma). Se utilizó un microscopio Leica DMR. El contaje de las células se expresó en relación con la superficie de la capa granular cuantificada (mm²) mediante el programa informático Quantity One, medido con un densitómetro (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Biorad). Este método de cuantificación representa un recuento celular normalizado (Amrein et al., 2011), para controlar la proliferación celular entre las diferentes etapas del desarrollo estudiadas (PND 37 y PND 58).

Análisis de los datos

Los datos recopilados fueron analizados con el programa informático GraphPad Prism, Version 6. Los resultados se expresaron como la media de los valores con el error estándar de la media.

Se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

1. T-test para comparar por un lado las diferencias basales en la proliferación celular en ratas PND 37 y 58, y por otro lado las áreas (mm²) del DG del hipocampo de las ratas de ambas edades.
2. ANOVA de dos vías para comparar el efecto de la edad (PND 37 y 58) en la proliferación celular y la extensión del DG en el hipocampo (Bregma -1.80 mm a -5.60 mm). Seguido del análisis post hoc Fisher's LSD para comprobar en número de células Ki-67 positivas a diferentes longitudes del bregma.
3. ANOVA de una vía para comparar a cada edad (PND 37 y 58) el efecto del tratamiento con d-anfetamina (control, agudo y crónico).
4. ANOVA de dos vías para comparar el efecto del tratamiento con d-anfetamina (control, agudo y crónico) y el número de células Ki-67 positivas cuantificadas en ratas adolescentes y jóvenes-adultas.

Resultados

Comparaciones en la proliferación celular entre ratas adolescentes y adultas

Se estudió la diferencia en la proliferación celular entre ambos grupos de estudio ajustando el número de células resultantes del contaje por el área del DG cuantificada. Se tomaron como referencia las muestras control de las ratas adolescentes (PND 37) y las jóvenes-adultas (PND 58) para comparar las diferentes edades estudiadas. Se observó que entre ambos grupos había diferencias basales significativas en el número de células cuantificadas (T-test, $p < 0.001$). En ratas adolescentes se observaron un mayor número de células positivas para el Ki-67/área (mm²) (89

± 5.3 células/área, $n=6$); en el caso de las ratas jóvenes-adultas se observó un número inferior de células positivas para el Ki-67/área (mm^2) (49 ± 4.6 células/área, $n=6$) (figura 4).

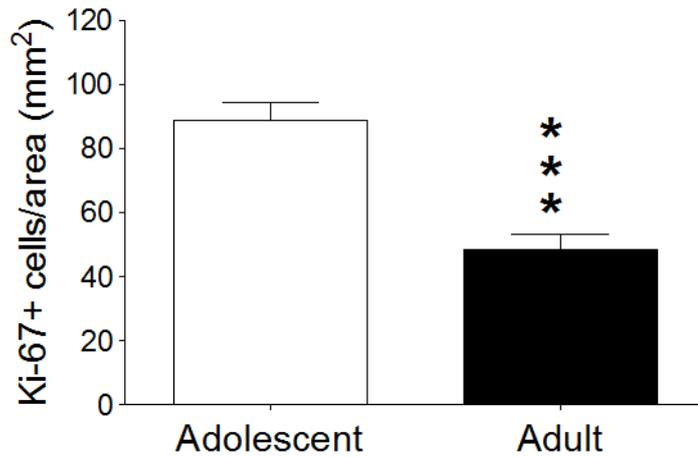


Figura 4. Representación de las diferencias basales en la proliferación celular en ratas adolescentes (PND 37, $n=6$) y ratas jóvenes-adultas (PND 58, $n=6$). En cada columna se observan la media \pm SEM del número células (Ki-67 positivas) totales y corregidas por área cuantificada. (T-test de dos colas, $p < 0.001$ ***).

Seguidamente, no se observaron diferencias significativas entre las áreas del DG del hipocampo de las ratas adolescentes ($10 \pm 0.4 \text{ mm}^2$) y las jóvenes-adultas ($11 \pm 0.8 \text{ mm}^2$) (T-test, $p > 0.05$) (figura 5).

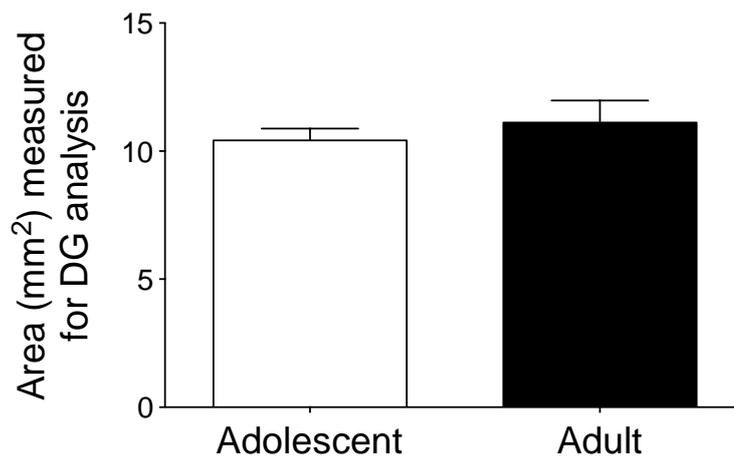


Figura 5. Comparación del área (mm^2) del DG del hipocampo en ratas adolescentes y ratas jóvenes-adultas. En cada columna se representa la media \pm SEM. (T-test de dos colas, $p > 0.05$).

Una vez vistas las diferencias en el número de células de nueva proliferación entre ambas edades, es interesante ver las diferencias a lo largo de la extensión hipocampal. Una vez contadas las células Ki-67 positivas en la extensión del DG del hipocampo (Bregma -1.80 mm a -5.60 mm) de los grupos control (PND 37 y 58), se realizó un test estadístico ANOVA de dos vías, donde se observó que a lo largo de la extensión estudiada (figura 6) el grupo control de las ratas PND 37 posee un número mayor de células Ki-67 positivas que el grupo control de las ratas PND 58 (ANOVA, $F(14, 147)=4.415$, $p<0.001$). En particular, se encontraron diferencias significativas entre grupos a lo largo del bregma (-2.66 mm ($p<0.01^{**}$), -3.14 mm ($p<0.05^*$), -3.86 ($p<0.05^*$), -4.35 ($p<0.05^*$) y -5.06 mm ($p<0.001^{***}$)).

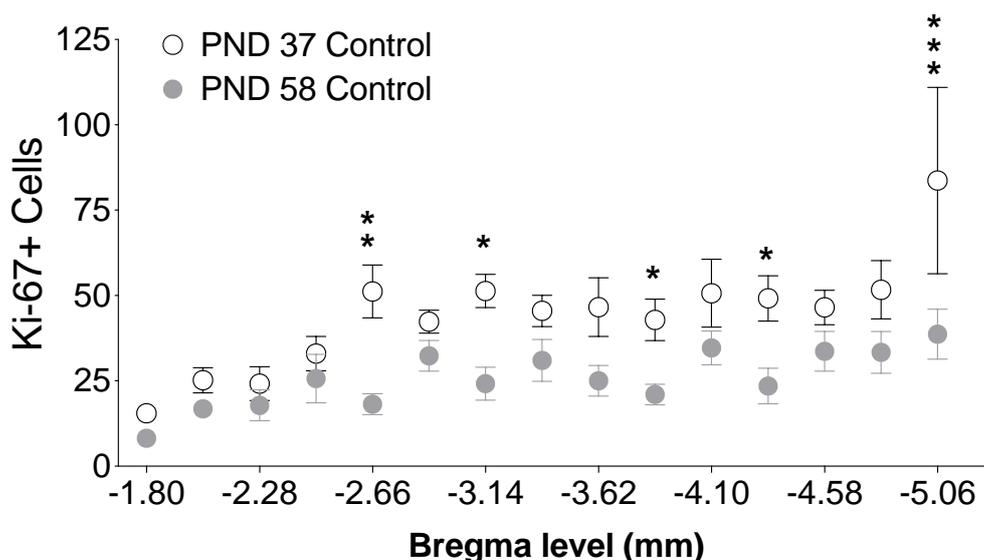


Figura 6. Comparación del número de células en diferentes puntos del bregma en los grupos control de las ratas adolescentes tempranas (PND 37, n=6) y las jóvenes-adultas (PND 58, n=6). (Análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías). En el gráfico se han representado las barras de error para las ratas PND 37 y las PND 58 y también se encuentran representados uno asteriscos que representarían la significancia de la diferencia en diferentes puntos del bregma, con diferentes puntos de significancia $p<0.05^*$; $p<0.01^{**}$ y $p<0.001^{***}$, según el análisis post hoc Fisher's LSD realizado.

Efecto de la d-anfetamina en ratas adolescentes (PND 37)

Una vez vistas diferencias basales entre las ratas adolescentes y las jóvenes-adultas, se compararon los tres tratamientos de los sujetos PND 37. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos de estudio ($F(2, 15)=0.4057$, $p>0.05$) en la proliferación celular de las ratas adolescente (control: 89 ± 5 células/área; el agudo; 93 ± 13 células/área; crónico: 82 ± 6 células/área) (figura 7).

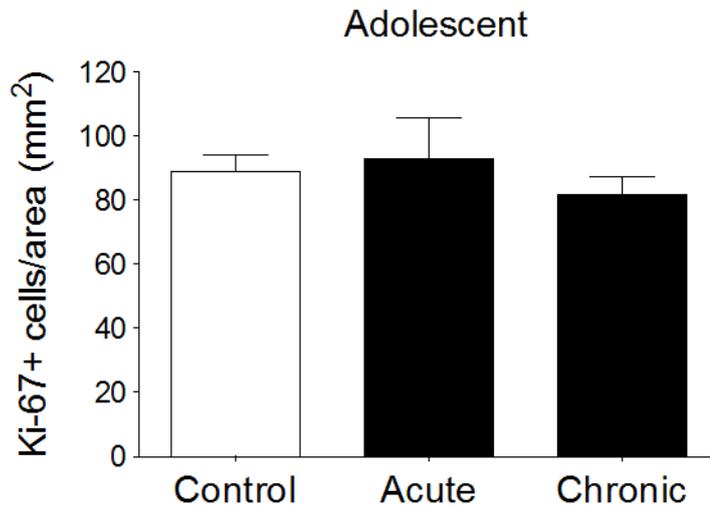


Figura 7. Representación gráfica de los efectos de la d-anfetamina comparando el número de células Ki-67 positivas corregidas por el área (mm²) cuantificada en los tratamientos control (Control, n=6), agudo (Acute, n=6) y crónico (Chronic, n=6) en las ratas de PND 37. (ANOVA de una vía, $F(2, 15)=0.4057$, $p>0.05$).

Efecto de la d-anfetamina en ratas jóvenes-adultas (PND 58)

A continuación, se puede ver la comparación entre tratamientos para las ratas de PND 58 (figura 8). Se realizó un test ANOVA de una vía ($F(2, 15)=3.810$, $p<0.05$), en el que se observó que entre el tratamiento agudo (57 ± 2 células/área) y el crónico (43 ± 4 células/área) había diferencias significativas, donde el número de células Ki-67 positivas de las ratas a las que se les administró el tratamiento agudo es mayor que el de las ratas tratadas de manera crónica con d-anfetamina. Al comparar el grupo control (49 ± 5 células/área) con el agudo y el crónico no se observaron diferencias significativas.

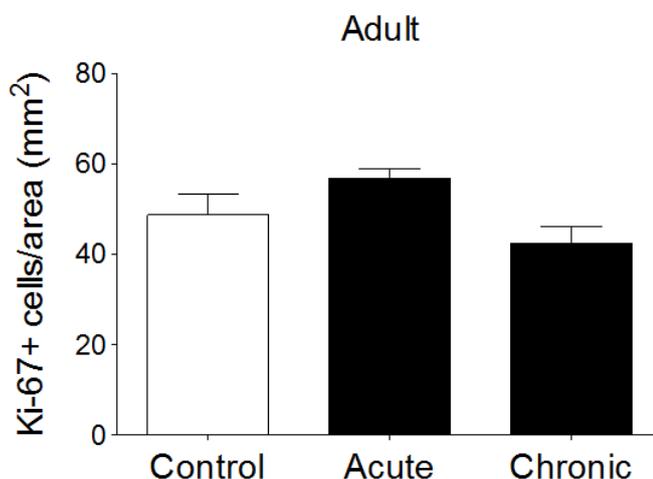


Figura 8. Representación gráfica de los efectos de la d-anfetamina comparando el número de células Ki-67 positivas corregidas por el área cuantificada de los tratamientos

control (Control, n=6), agudo (Acute, n=6) y crónico (Chronic, n=6) en las ratas de PND 58. (ANOVA de una vía, $p < 0,05$).

Comparación del efecto de la d-anfetamina entre ratas adolescentes y jóvenes-adultas

A modo de conclusión, se compararon los resultados comentados anteriormente de los tratamientos de las ratas PND 37 y las de PND 58. Se realizó un análisis ANOVA de dos vías, donde se obtuvieron diferencias significativas entre las edades de los sujetos (PND 37 y PND 58: $F(1, 30)=50,05$, $p < 0,001$) y no se obtuvieron diferencias significativas al compararse los efectos tratamientos (control, agudo, crónico: $F(2, 30)=0,058$, $p > 0,05$), ni la interacción entre la edad y el tratamiento ($F(2, 30)=0,05$, $p > 0,05$) (figura 9).

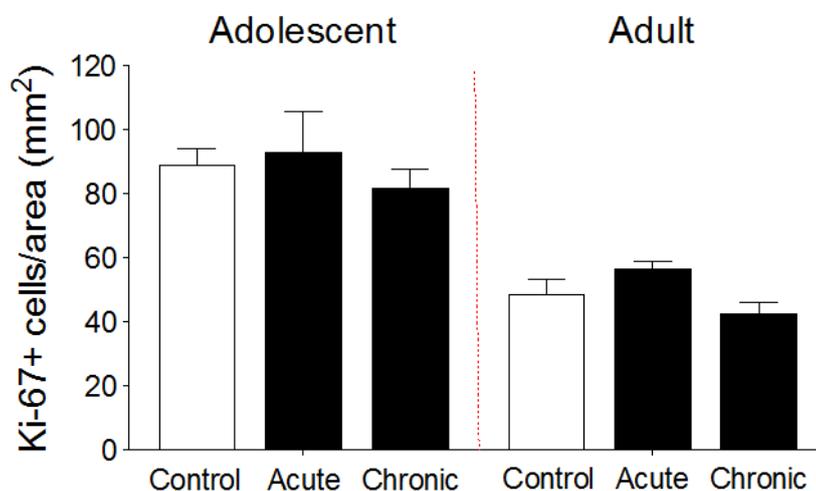


Figura 9. Representación gráfica de la comparación de los efectos de la d-anfetamina comparando el número de células Ki-67 positivas corregidas por el área cuantificada en los tratamientos control (Control, n=6), agudo (Acute, n=6) y crónico (Chronic, n=6) tanto en ratas de PND 37 como en ratas de PND 58. (ANOVAS de dos vías, $p > 0,05$).

Discusión

Índice de proliferación basal en rata adolescente y jóvenes-adultas

Inicialmente, las diferencias en la proliferación celular obtenidas de los grupos basales entre las edades estudiadas de las ratas, resultaron significativas. De manera que se obtuvieron un mayor número de células en las ratas adolescentes que en las jóvenes-adultas, destacándose ciertos puntos del bregma en los que la diferencia tuvo diferentes niveles de significancia. Sin embargo, estos resultados podrían venir mediados por la actividad energética neuronal durante el periodo adolescente, ya que diferente que en el periodo joven-adulto, a la vez que el flujo de

monoaminas también disminuye a medida que se va avanzando en edad, de manera que a lo largo del periodo adolescente la síntesis se ha visto afectada, disminuyendo la proliferación celular en el DG del hipocampo (Teicher et al., 1993. Andersen et al., 1997).

Efecto de la d-anfetamina en ratas adolescentes y jóvenes-adultas

La administración aguda de d-anfetamina (5 mg/Kg, durante un día, una dosis cada 3h) no afectó significativamente a la proliferación celular en el DG del hipocampo de las ratas adolescentes y jóvenes-adultas. Seguidamente, los resultados del tratamiento crónico de d-anfetamina mostraron la misma respuesta que en el caso del tratamiento agudo; al comparar la administración crónica, entre las ratas PND 37 y PND 58, del fármaco (5 mg/kg, durante cuatro días, una dosis cada 3h) no se encontraron diferencias significativas, de manera que podemos afirmar que el tratamiento crónico de d-anfetamina no moduló la proliferación celular en el DG del hipocampo de la rata. Sin embargo, sí que se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento agudo y crónico de las ratas jóvenes-adultas, mostrando una leve disminución en el número de células Ki-67 positivas en las ratas tratadas crónicamente. Estos resultados sugieren que la disminución en la proliferación celular hace que el sujeto sea más vulnerable a la adicción, siendo la edad un factor importante a tener en cuenta ya que en comparación con la etapa adolescente los niveles energéticos disminuyen, lo cual influye negativamente en la proliferación y favoreciendo a la recaída.

Se ha utilizado la d-anfetamina como referente en estudios realizados con los isómeros anfetamínicos, demostrándose que producen rápidamente grandes aumentos en el flujo de salida de la dopamina y la noradrenalina en el córtex prefrontal y la dopamina en el estriado, prediciendo que estos fármacos podrían ser utilizados para el tratamiento del déficit de atención y la hiperactividad (ADHD) (Arnold et al., 1972). Por lo que, basándonos en las observaciones obtenidas y a partir de la literatura revisada, en este estudio la d-anfetamina al no producir cambios significativos en la proliferación celular en el DG del hipocampo de las ratas PND 37 refuerza la utilización del fármaco en el tratamiento juvenil de la hiperactividad y el déficit de atención (ADHD) (Arnold et al., 1972, 1973; James et al., 2001; Teixeira et al., 2014).

Por otra parte, las drogas de abuso tienen efectos variados en la diferenciación neuronal, la supervivencia y la muerte. De manera que algunos de estos fármacos que suprimen la proliferación, podrían evitar lesiones sobre la neurogénesis sin reflejar sus efectos en la salud o supervivencia de las neuronas maduras (Zhuang et al., 2005; Zohar et al., 2006); estos efectos en la proliferación de estas drogas de abuso estarían ligados a la cronicidad, de la dosis y del fármaco, que podrían afectar a la proliferación de una manera o de otra (Abrous et al., 2002; Fischer et al., 2008; Mandyam et al., 2008; Shingo y Kito, 2005; Yamaguchi et al., 2004). Tal como se sabe, la proliferación celular en el hipocampo puede verse afectada al estimular la activación o el bloqueo de los receptores NMDA (receptores ionotrópicos de glutamato), ya que podría disminuir o aumentar respectivamente el proceso (Gould et al., 1997), por lo que la administración de d-anfetamina podría facilitar la liberación de glutamato, interfiriendo a la vez en la proliferación celular.

Otros estudios realizados también con la conformación dextrógira de la anfetamina han demostrado que en el tratamiento agudo pero con una dosis superior a la utilizada en este experimento (10 mg/Kg) en ratas adultas la proliferación celular en el DG del hipocampo no se

vio afectada (Mao y Wang, 2001). Por otra parte, también se obtuvieron resultados similares, en los que la neurogénesis no sufrió ningún cambio significativo en el tratamiento crónico de anfetamina (2,5 mg/Kg) en ratas adultas (Barr et al., 2010). Por lo que, al ser los resultados obtenidos para ambos tratamientos, realizados con las mismas cantidades (5 mg/Kg), iguales para los sujetos adolescentes y para los jóvenes-adultos, indica que podría ser que la dosis administrada no fuese la adecuada como para conseguir algún tipo de cambio significativo en la proliferación celular en el DG del hipocampo, siendo la dosis administrada una incógnita interesante que resolver en futuros estudios.

Conclusión

A diferentes periodos de edad en ratas adolescente (PND 37) y jóvenes-adultas (PND 58) se obtuvieron diferencias significativas basales en la proliferación celular en el DG del hipocampo, obteniéndose un número superior de células/área (mm²) en las ratas PND 37 que en las PND 58. En el caso de los tratamientos agudo y crónico no se obtuvieron diferencias significativas para ambas edades, por lo que la administración agudo y crónica de d-anfetamina no afectó significativamente a la proliferación celular en el DG, solamente se observaron diferencias entre los tratamientos en las ratas jóvenes-adultas (PND 58) donde se contaron un número de células Ki-67 positivas inferior en las tratadas crónicamente, que las que recibieron el tratamiento agudo, lo que indica que a edades más avanzadas la proliferación celular en el DG del hipocampo es más vulnerable a la adicción, debido al efecto producido por la administración crónica de d-anfetamina.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología del Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Agradecimiento al grupo de colaboradores del laboratorio, en especial a mi tutora M. Julia García Fuster y a Rubén García Cabrerizo, por la ayuda prestada durante el desarrollo del trabajo.

Bibliografia

1. 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), 3656-3662.
2. Altman, J., & Bayer, S. A. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *Journal of comparative neurology*, 301(3), 343-364.
3. Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.
4. Amrein, I., Isler, K., & Lipp, H. P. (2011). Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 978-987.
5. Andersen, S. L., Dumont, N. L., & Teicher, M. H. (1997). Developmental differences in dopamine synthesis inhibition by (\pm)-7-OH-DPAT. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 356(2), 173-181.
6. Arnold, L. E., Wender, P. H., McCloskey, K., & Snyder, S. H. (1972). Levoamphetamine and dextroamphetamine: Comparative efficacy in the hyperkinetic syndrome: Assessment by target symptoms. *Archives of General Psychiatry*, 27(6), 816-822.
7. Arnold, L. E., Kirilcuk, V., Corson, S. A., & Corson, E. O. L. (1973). Levoamphetamine and dextroamphetamine: Differential effect on aggression and hyperkinesis in children and dogs. *American journal of Psychiatry*, 130(2), 165-170.
8. Barr, J. L., Renner, K. J., & Forster, G. L. (2010). Withdrawal from chronic amphetamine produces persistent anxiety-like behavior but temporally-limited reductions in monoamines and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 59(6), 395-405.
9. Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2003). Parsing reward. *Trends in neurosciences*, 26(9), 507-513.
10. Bett, W. R. (1946). Benzedrine sulphate in clinical medicine. *Postgraduate medical journal*, 22(250), 205.
11. Carvalho, M., Carmo, H., Costa, V. M., Capela, J. P., Pontes, H., Remião, F., ... & de Lourdes Bastos, M. (2012). Toxicity of amphetamines: an update. *Archives of toxicology*, 86(8), 1167-1231.
12. Chambers, R. A., Potenza, M. N., Hoffman, R. E., & Miranker, W. (2004). Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. *Neuropsychopharmacology*, 29(4), 747-758.
13. Chambers, R. A. (2013). Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug and alcohol dependence*, 130(1), 1-12.
14. Cox, B. M., Shah, M. M., Cichon, T., Tancer, M. E., Galloway, M. P., Thomas, D. M., & Perrine, S. A. (2014). Behavioral and neurochemical effects of repeated MDMA administration during late adolescence in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 229-235.
15. Easton, N., Steward, C., Marshall, F., Fone, K., & Marsden, C. (2007). Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. *Neuropharmacology*, 52(2), 405-414.

16. Endl, E., Hollmann, C., & Gerdes, J. (2009). Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Essential Cytometry Methods*, 397.
17. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2013). European Drug Report 2013: Trends and Developments.
18. Fischer, J. F., & Cho, A. K. (1979). Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 208(2), 203-209.
19. Fischer, S. J., Arguello, A. A., Charlton, J. J., Fuller, D. C., Zachariou, V., & Eisch, A. J. (2008). Morphine blood levels, dependence, and regulation of hippocampal subgranular zone proliferation rely on administration paradigm. *Neuroscience*, 151(4), 1217-1224.
20. Flórez, J. (1997) Farmacología humana. 3ª ed. Masson, S.A., Madrid.
21. García-Fuster, M. J., Perez, J. A., Clinton, S. M., Watson, S. J., & Akil, H. (2010). Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *European Journal of Neuroscience*, 31(1), 79-89.
22. Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., & Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience*, 17(7), 2492-2498.
23. Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J., & Nutt, D. J. (2013). Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. *Journal of Psychopharmacology*, 27(6), 479-496.
24. Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 565-598.
25. James, R. S., Sharp, W. S., Bastain, T. M., Lee, P. P., Walter, J. M., Czarnolewski, M., & Castellanos, F. X. (2001). Double-blind, placebo-controlled study of single-dose amphetamine formulations in ADHD. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 40(11), 1268-1276.
26. King, G., Alicata, D., Cloak, C., & Chang, L. (2010). Neuropsychological deficits in adolescent methamphetamine abusers. *Psychopharmacology*, 212(2), 243-249.
27. Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58.
28. Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238.
29. Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., van Praag, H., ... & Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS biology*, 4(12), e409.
30. LE MOAL, M. I. C. H. E. L., & SIMON, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiological reviews*, 71(1), 155-234.
31. Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3), 179-193.
32. Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R., & Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*, 333(6040), 353-357.
33. Luu, P., Sill, O. C., Gao, L., Becker, S., Wojtowicz, J. M., & Smith, D. M. (2012). The role of adult hippocampal neurogenesis in reducing interference. *Behavioral neuroscience*, 126(3), 381.
34. Mandyam, C. D., Wee, S., Crawford, E. F., Eisch, A. J., Richardson, H. N., & Koob, G. F. (2008). Varied access to intravenous methamphetamine self-administration

- differentially alters adult hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*, 64(11), 958-965.
35. Mandyam, C. D., & Koob, G. F. (2012). The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends in neurosciences*, 35(4), 250-260.
 36. Mao, L., & Wang, J. Q. (2001). Gliogenesis in the striatum of the adult rat: alteration in neural progenitor population after psychostimulant exposure. *Developmental Brain Research*, 130(1), 41-51.
 37. McLean, J. R., & McCartney, M. (1961). Effect of d-amphetamine on rat brain noradrenaline and serotonin. *Experimental Biology and Medicine*, 107(1), 77-79.
 38. Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28, 223-250.
 39. Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *science*, 278(5335), 58-63.
 40. Ohnuma, S. I., & Harris, W. A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron*, 40(2), 199-208.
 41. Peterson, D. A. (2002). Stem cells in brain plasticity and repair. *Current opinion in pharmacology*, 2(1), 34-42.
 42. Rakic, P., Bourgeois, J. P., & Goldman-Rakic, P. S. (1994). Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Progress in brain research*, 102, 227.
 43. Rothman, R. B., Baumann, M. H., Dersch, C. M., Romero, D. V., Rice, K. C., Carroll, F. I., & Partilla, J. S. (2001). Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*, (39), 32-41.
 44. Rothman, R. B., & Baumann, M. H. (2003). Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *European journal of pharmacology*, 479(1), 23-40.
 45. Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, (182), 311-22.
 46. Seiden, L. S., & Ricaurte, G. A. (1987). Neurotoxicity of methamphetamine and related drugs. *Psychopharmacology: The third generation of progress*, 359-366.
 47. Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(18), 7153-7160.
 48. Shingo, A. S., & Kito, S. (2005). Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *Journal of neural transmission*, 112(11), 1475-1478.
 49. Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A., & Gould, E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *Journal of Comparative Neurology*, 437(4), 496-504.
 50. Tanapat, P., Hastings, N. B., & Gould, E. (2005). Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose-and time-dependent manner. *Journal of Comparative Neurology*, 481(3), 252-265.
 51. Teicher, M. H., Barber, N. I., Gelbard, H. A., Gallitano, A. L., Campbell, A., Marsh, E., & Baldessarini, R. J. (1993). Developmental differences in acute nigrostriatal and mesocorticolimbic system response to haloperidol. *Neuropsychopharmacology*, 9(2), 147-156.

52. Teixeira-Gomes, A., Costa, V. M., Feio-Azevedo, R., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., & Capela, J. P. S. (2014). The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *International Journal of Developmental Neuroscience*.
53. Villemagne, V., Yuan, J., Wong, D. F., Dannals, R. F., Hatzidimitriou, G., Mathews, W. B., ... & Ricaurte, G. A. (1998). Brain dopamine neurotoxicity in baboons treated with doses of methamphetamine comparable to those recreationally abused by humans: evidence from [11C] WIN-35,428 positron emission tomography studies and direct in vitro determinations. *The Journal of neuroscience*, *18*(1), 419-427.
54. Vorhees, C. V., Reed, T. M., Morford, L. L., Fukumura, M., Wood, S. L., Brown, C. A., ... & Williams, M. T. (2005). Periadolescent rats (P41–50) exhibit increased susceptibility to D-methamphetamine-induced long-term spatial and sequential learning deficits compared to juvenile (P21–30 or P31–40) or adult rats (P51–60). *Neurotoxicology and teratology*, *27*(1), 117-134.
55. Wang, J. Q., & McGINTY, J. F. (1999). Glutamate-dopamine interactions mediate the effects of psychostimulant drugs. *Addiction biology*, *4*(2), 141-150.
56. White, F. J., & Kalivas, P. W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and alcohol dependence*, *51*(1), 141-153.
57. Yamaguchi, M., Suzuki, T., Seki, T., Namba, T., Juan, R., Arai, H., ... & Asada, T. (2004). Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1025*(1), 351-362.
58. Zhuang, S. Y., Bridges, D., Grigorenko, E., McCloud, S., Boon, A., Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (2005). Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology*, *48*(8), 1086-1096.
59. Zohar, O., Getslev, V., Miller, A. L., Schreiber, S., & Pick, C. G. (2006). Morphine protects for head trauma induced cognitive deficits in mice. *Neuroscience letters*, *394*(3), 239-242.